

THÈSE

PRÉSENTÉE

A LA FACULTE DE PHARMACIE DE NANCY

POUR OBTENIR

le titre de Docteur de l'Université de Nancy

MENTION " PHARMACIE "

PAR

DESCARMES Michel, Louis, André

Pharmacien

Ancien Stagiaire de Recherches à l'Institut National d'Hygiène

Ex-préparateur de Chimie Analytique

Diplômé d'études supérieures de Chimie Biologique

né à NANCY, le 8 avril 1924

Influence de l'irradiation ultra-violette sur la teneur en stérols des levures

(*Saccharomyces cerevisiae*,
Rhodotorula mucilaginosa)

Soutenue le 18 novembre 1955, devant la Commission d'Examen.

Président	MM. KAYSER, professeur
Juges	{ FRANQUET, professeur.
	{ Mlle BESSON, maître de conférences.

THÈSE

PRÉSENTÉE

A LA FACULTE DE PHARMACIE DE NANCY

POUR OBTENIR

le titre de Docteur de l'Université de Nancy

MENTION " PHARMACIE "

PAR

DESGHARMES Michel, Louis, André

Pharmacien

Ancien Stagiaire de Recherches à l'Institut National d'Hygiène

Ex-préparateur de Chimie Analytique

Diplômé d'études supérieures de Chimie Biologique

né à NANCY, le 8 avril 1924

Influence de l'irradiation ultra-violette sur la teneur en stérols des levures

(*Saccharomyces cerevisiae*,
Rhodotorula mucilaginosa)

Soutenue le 18 novembre 1955, devant la Commission d'Examen.

Président	MM. KAYSER, professeur
Juges	{ FRANQUET, professeur.
	{ Mlle BESSON, maître de conférences.

THÈSE

A LA FACULTÉ DE MÉDECINE DE NANCY

par le Docteur en Médecine de Nancy
Monsieur "Président"

DESCHARMES Michel Louis Adolphe



FACULTE DE PHARMACIE
DE NANCY

ADMINISTRATION

Professeur : F. KAYSER
Professeur : A. MEUNIER
Secrétaire : P. RADUREAU

PERSONNEL ENSEIGNANT

Professeurs

M. MEUNIER A. Pharmacie Galénique
Mlle FRANCOIS M.Th. Matière Médicale
MM. KAYSER F. Chimie
FRANQUET R. Botanique
MARCHAL J.G. Microbiologie
STEIMETZ E. Sciences Naturelles
BLOCH J.M. Toxicologie
SOLEIL J. Pharmacie Chimique

Maîtres de Conférences Agrégés

Mlle BESSON S. Pharmacodynamie
N... Sciences Physiques

Chargés de Cours complémentaires

M. MEUNIER A. Hydrologie
Mlle FRANCOIS M.Th. Hygiène
MM. FRANQUET T. Cryptogamie
MARCHAL J.G. Parasitologie
STEIMETZ E. Mycologie - Minéralogie
BLOCH J.M. Chimie Minérale
SOLEIL J. Chimie organique
ROBLAT R. Déontologie

Professeur à la Faculté de Droit

BERNARDOSE A. Physique
MIRJOLET M. Chimie analytique

Chefs de Travaux

M. ANZIANI F. Chimie
Mme LASSEUR A. Microbiologie - Parasitologie
MM. BERNARDOSE A. Physique
MIRJOLET M. Sciences Pharmaceutiques
BENE R. Chargé des fonctions de Chef de Travaux pratiques de Micrographie
PIERFITTE M. Chargé des travaux pratiques de Chimie Biologique
N... Chargé des travaux pratiques de Microbiologie technique
N... Chargé des travaux pratiques de Physique.

Doyen Honoraire: M. RICHARD, Recteur de l'Académie de Besançon,

Professeur honoraire: M. CORDEBARD H.

Maître de Conférences honoraire: Dr VERNIER P.

A LA MEMOIRE DE MON PERE

A MA MERE

A MA FEMME

A TOUS LES MIENS

En gage de ma très profonde
affection.

A mon Maître et Président de Thèse

MONSIEUR LE PROFESSEUR KAYSER
Doyen de la Faculté de Pharmacie

A mes Juges:

MONSIEUR LE PROFESSEUR FRANQUET
Professeur de Botanique

MADÉMOISELLE S. BESSON
Maître de Conférences
de Pharmacodynamie

A tous mes Maîtres de la Faculté de
Pharmacie de Nancy.

Hommage respectueux
et reconnaissant.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR BUGNARD

Directeur de l'Institut National
d'Hygiène

A MONSIEUR LE DOCTEUR HERBEUVAL

Professeur Agrégé à la Faculté de Médecine
Chargé de l'enseignement des maladies des
Vieillards.

Témoignage de gratitude.

-TABLE DES MATIERES-

Pages:

- AVANT-PROPOS.	
- INTRODUCTION	1
- <u>CHAPITRE I :</u>	
Action du rayonnement ultra-violet sur la levure.	4
§ I.- Généralités sur le mode d'action des rayons ultra-violets	4
§ II.-Techniques d'irradiation	10
- <u>CHAPITRE II:</u>	
Etude du dosage des stérols dans la levure. Variations du taux des stérols par rapport au poids sec	15
§ I.- Généralités sur le rôle des stérols et leur biosynthèse par les micro-organismes.	15
§ II.- Technique du dosage des stérols	21
A/ Modes d'extraction des stérols de la levure	22
B/ Réaction colorée proprement dite	25
§ III.-Résultats expérimentaux	27
A/ Dosages sur la souche-mère non irradiée	27
B/ Dosages sur des levures descendant de souches irradiées	29
- <u>CHAPITRE III.-</u>	
Etude de la teneur moyenne d'une cellule en stérols.	33
§ I.- Technique de la numération	35
§ II.- Résultats expérimentaux	36
A/ Teneur en stérols d'une cellule de levure non irradiée.	36
B/ Teneur en stérols d'une cellule de levure descendant de souches irradiées	39

- CHAPITRE IV:

Etude du rapport stérols/azote total dans la levure	43
§ I.- Technique du dosage de l'Azote total	44
§ II.- Résultats expérimentaux	45

- CHAPITRE V :

Variations comparées des acides nucléiques et des stérols dans la levure non irradiée, et dans celle provenant de souches irradiées	49
§ I.- Généralités sur le rôle biologique des acides nucléiques	49
§ II.- Technique de dosage des acides nucléiques	52
A/ extraction des deux acides nucléiques de la matière cellulaire	52
B/ Réactions colorées permettant le dosage des deux types d'acides nucléiques	55
§ III.-Résultats expérimentaux	56
A/ Acide désoxyribonucléique	56
B/ Acide ribonucléique	60

- CHAPITRE VI.-

Les stérols chez <i>Rhodotorula Mucilaginosa</i> et chez différents mutants provenant de son irradiation	62
--	----

- CONCLUSIONS

- BIBLIOGRAPHIE

- A V A N T P R O P O S -
=====

Après avoir terminé mes études, j'eus le désir d'approfondir mes connaissances en Chimie Biologique: c'est ainsi que je m'inscrivis au cours du Certificat d'Etudes Supérieures de Chimie Biologique qu'enseignait Monsieur le Doyen KAYSER.

Durant cette année, j'avais déjà mis à profit quelques loisirs pour travailler au laboratoire de la Maison Départementale de Secours. Monsieur le Docteur HERBEUVAL, Professeur agrégé à la Faculté de Médecine, Chef du service hospitalier, voulut bien par la suite m'y retenir pendant plus d'un an. C'est dans ce cadre que, à l'aide de ses conseils éclairés, j'entrepris un premier travail sur le dosage des hormones stéroïdes du sang, travail placé sous la haute direction de Monsieur le Professeur BUGNARD, Directeur de l'Institut National d'Hygiène.

Malheureusement plusieurs difficultés se présentèrent à moi, qui m'empêchèrent de mener à bien ce premier travail.

C'est donc ainsi que je fus amené à entreprendre un travail expérimental dans le cadre de la Faculté de Pharmacie.

Monsieur le Doyen KAYSER me proposa alors d'apporter une contribution aux travaux sur les stérols qui sont depuis longtemps à l'étude dans son laboratoire. C'est lui qui, tout au long de ces recherches, n'a cessé de me prodiguer ses conseils et a suivi avec attention et dévouement mes efforts; qu'il veuille bien trouver ici l'expression de ma vive gratitude.

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance à Monsieur le Professeur FRANQUET qui m'a fait le grand honneur de juger ce travail auquel il a bien voulu prendre intérêt.

Mademoiselle BESSON, qui a accepté également de faire partie de mon Jury, a été pour moi un Maître vigilant et dévoué lorsque j'étais son élève aux Travaux pratiques du Certificat de Chimie Biologique. Je lui témoigne ici ma profonde gratitude.

Au Laboratoire de Chimie, j'ai toujours trouvé une atmosphère de franche cordialité et je veux assurer mes camarades - en particulier Messieurs PIERFITTE et VILLOUTREIX, auxquels je veux associer Mademoiselle HASSER, aide technique - de toute mon amitié.

c
o o

- I N T R O D U C T I O N -

=====

La question des stérols est depuis longtemps à l'étude au Laboratoire de Chimie, et nous avons pensé dans ce travail y apporter une modeste contribution.

La biosynthèse des stérols par de nombreux micro-organismes est évidente, puisque, cultivés sur des milieux sans stérols, ces êtres monocellulaires arrivent à en contenir des quantités relativement grandes: quelques millièmes de leur poids sec environ. Le mécanisme de cette biosynthèse est encore loin d'être bien connu. On sait seulement que l'acétate peut en être le premier terme; d'autre part, des compagnons de l'ergostérol, non identifiés, mais voisins chimiquement des stérols, ont été administrés à la souris et transformés par elle en cholestérol. Cela laisse à penser que le mécanisme de la biosynthèse est le même chez tous les êtres vivants, et que, comme les mammifères, les êtres monocellulaires transforment d'abord les molécules en C_2 (acétate), successivement en molécules en C_4 (acétyl-acétate), puis en molécules en C_5 à structure isoprénolide (acide $\beta . \beta$ -diméthylcrotonique); le squalène, que certains auteurs considèrent comme un précurseur des stérols chez les Mammifères, est-il synthétisé en quantités appréciables par les microorganismes? Et, chez ces derniers, est-il également un précurseur des stérols? on ne le sait pas encore. Nous exposerons d'ailleurs brièvement l'état actuel de cette question dans notre Chapitre II.

Un moyen d'étude de la biosynthèse des stérols pourrait être l'obtention d'une variété pauvre en stérols, mais cependant facile à cultiver, à partir d'un microorganisme habituellement riche en stérols: la comparaison de la composition chimique de la souche-mère et de la variété pauvre en stérols pourrait alors montrer "l'endroit" où la chaîne de la biosynthèse était interrompue; l'accumulation de certains composés

chimiques serait susceptible de fournir des indications sur les précurseurs, si on arrivait à identifier ceux-ci. Telle a été notre première idée, en l'appliquant à un organisme monocellulaire, *Saccharomyces cerevisiae*; nous pouvions supposer que des cellules de levure pauvres en stérols seraient viables, puisqu'il existe des algues monocellulaires et des bactéries chez lesquelles on ne peut déceler de stérols, et qui cependant n'ont pas un métabolisme très différent de celui des espèces voisines.

Les stérols ne sont donc pas des constituants universels du protoplasme et l'on pouvait penser obtenir, par mutation, des cellules qui en seraient dépourvues, l'agent mutagène ayant inhibé le fonctionnement d'un enzyme intéressé dans la biosynthèse.

Il était permis, au contraire, de supposer une augmentation de la biosynthèse des stérols sous l'influence de l'agent mutagène; soit par inhibition d'un enzyme qui, normalement, en assurerait la destruction lente; soit que la cellule ait augmenté la synthèse des stérols pour suppléer un enzyme défaillant dans une autre lignée métabolique. Si cette éventualité avait pu être réalisée, on aurait pu entrevoir le rôle des stérols chez les êtres monocellulaires.

Nous avons employé comme agent mutagène le rayonnement ultra-violet, car nous ne connaissons aucun auteur qui ait dosé systématiquement les stérols après irradiation ultra-violette dans *Saccharomyces cerevisiae*.

Cependant, au moment de rédiger ce travail, nous pensons devoir relater un article récent publié en U.R.S.S., traitant de l'influence des rayons X sur le métabolisme stérique de la levure [GAL'COVA et coll. (1954) (26)]. Les auteurs russes ont montré que *S. cerevisiae*, soumis à l'action des Rayons X et cultivé sur milieu gélosé, présente une augmentation de la teneur en ergostérol plus rapide que celle du témoin non irradié. Les conditions expérimentales de ces auteurs sont très différentes des nôtres puisqu'il s'agit de rayons X et non de rayons ultra-violets, d'une part, et que, d'autre part, les dosages sont faits directement sur les colonies qui poussent sur gélose et non sur les produits de culture en milieu liquide qui peuvent en provenir.

Nous avons donc, dans ce travail, dosé systématiquement les stérols sur des levures descendant des levures irradiées, et que nous cultivions dans des conditions bien définies sur milieu synthétique. Notre but a été de rechercher si l'irradiation apportait une variation de la teneur en stérols. Mais nous nous sommes heurté à une difficulté classique: pour apprécier s'il y avait variation, à quelle grandeur cellulaire devons-nous comparer la teneur en stérols? Des raisons que nous indiquerons au fur et à mesure de l'exposé nous ont incité à l'exprimer successivement par rapport au poids total de substance fabriquée en un temps donné, par rapport à l'azote total cellulaire, et enfin par rapport aux acides nucléiques, à l'acide désoxyribonucléique, en particulier.

Le plan que nous avons suivi pour exposer notre travail est donc le suivant:

- I - Dans un premier chapitre, nous rappellerons quelques actions du rayonnement ultra-violet sur la levure, ainsi que la technique d'irradiation.
- II - Le deuxième chapitre traitera du dosage des stérols et de la variation de leur taux rapporté au poids total de substance sèche.
- III - A l'aide de numérations, nous déterminerons, dans un troisième chapitre, la teneur moyenne d'une cellule en stérols.
- IV - Dans le quatrième chapitre, nous essaierons d'établir le rapport des stérols à l'azote total cellulaire, et de voir si ce rapport varie notablement sous l'influence de l'irradiation ultra-violette.
- V - Le cinquième chapitre sera consacré à l'étude du dosage des acides nucléiques, constituants essentiels de la cellule, et du rapport des stérols, à l'acide désoxyribonucléique, d'une part, et à l'acide ribonucléique, d'autre part.
- VI - Enfin, nous réserverons notre sixième chapitre à l'étude des stérols, de l'azote total, et de l'acide désoxyribonucléique dans une levure rouge "Rhodotorula Mucilaginosa", ainsi que dans quelques-unes des souches provenant de son irradiation.

- C H A P I T R E I -
=====

- ACTION DU RAYONNEMENT ULTRA-VIOLET SUR LA LEVURE -

§ I.- GENERALITES SUR LE MODE D'ACTION DES RAYONS ULTRA-VIOLETS:

Le pouvoir stérilisant des radiations ultra-violettes est connu et mis à profit depuis longtemps; mais il y a seulement une trentaine d'années que l'on s'est aperçu de l'existence de degrés dans la stérilisation, certains germes irradiés pouvant rester viables, mais différer des germes initiaux par divers caractères. Une mise au point de la question a été faite dans cette Faculté même, par ROSSIGNOL en 1945 (70), puis complétée, à l'occasion de travaux originaux, par MARCHAL (1947) (57) enfin le livre de ERRERA et HERVE résume nos connaissances sur l'action biologique des radiations jusqu'en 1952 (22).

Nous ne voulons donc pas faire ici un exposé complet de la question, mais simplement rappeler quelques effets de l'irradiation ultra-violette sur les microorganismes, en particulier sur les levures. Nous verrons également les principales théories rendant compte de ces effets.

L'irradiation, si elle est suffisamment prolongée, rend les cellules non viables; WITKIN (1946 (85) et (1947)(86) a pu cependant, par irradiations répétées, obtenir ou sélectionner des races de microorganismes relativement résistantes aux rayons ultra-violets.

Il est également certain que des cellules qui paraissent avoir été rendues non viables, peuvent "guérir" par simple réexposition à la lumière visible: c'est la

photoréactivation. Pour éviter ce phénomène, les expérimentateurs sont obligés de maintenir dans l'obscurité les cultures tentées à partir des cellules irradiées, lorsqu'ils veulent étudier les particularités de leur métabolisme.

L'action des rayons ultra-violets s'exerce-t-elle sur la cellule elle-même, ou bien par l'intermédiaire du milieu ambiant? L'action directe est certaine; toutefois, il a été prouvé que l'irradiation préalable des solutions qui, ensuite, serviront de milieux de culture à des microorganismes, pouvait amener chez ces microorganismes des lésions analogues à celles que provoque l'irradiation directe. C'est ainsi que l'irradiation (en milieu aqueux) fait naître de l'eau oxygénée qui, par elle-même, est stérilisante et mutagène. Au contraire, la présence de composés sulfhydrilés, de cyanures (BACQ)(4), ou même de catalase (HAAS et coll. (30)) exerce un effet protecteur. Mais l'ultra-violet ne pénètre qu'à une faible profondeur dans les solutions aqueuses, et ses effets ne se font sentir que par une irradiation bien plus poussée que celle nécessaire pour agir directement sur des cellules rassemblées à la surface de milieux solides.

Toutes les radiations ultra-violettes de longueur d'onde comprise entre 2000 et 4000 angströms sont-elles également stérilisantes? Il a été montré d'abord que les radiations de longueur d'onde supérieure à 3.200 angströms étaient aussi peu efficaces que la lumière visible, puis on a établi des courbes d'action abiotique en fonction de la longueur d'onde du rayonnement ultra-violet auquel les microorganismes sont soumis, et on a vu que ces courbes étaient analogues pour tous les microorganismes irradiés quelle que soit leur nature. Cela a permis de penser qu'il existe, dans toutes les cellules vivantes, des composés chimiques identiques, capables d'absorber le rayonnement ultra-violet et d'être altérés par lui, l'altération pouvant avoir pour conséquence la mort de la cellule.

CASPERSSON (10) a pu montrer que ces courbes, rendant compte de l'action stérilisante des radiations en fonction de la longueur d'ondes, ont une allure qui se rapproche du spectre d'absorption des acides nucléiques: on pense communément depuis lors, que l'un au moins des modes d'action du rayonnement ultra-violet sur la cellule vivante, provient des modifications des

acides nucléiques sous l'influence des radiations qu'ils peuvent absorber, le maximum d'absorption se situant vers 2.600 angströms.

Plusieurs auteurs ont analysé les altérations que pouvaient subir les acides nucléiques purs par irradiation ultra-violette, et ils ont noté, par emploi de doses d'ailleurs considérables, des modifications de la partie pyrimidique de la molécule, une libération d'ammoniaque et d'urée, des modifications des liaisons existant entre les nucléotides et même une libération de phosphate minéral indiquant l'hydrolyse du tiers environ des mononucléotides existant dans les préparations irradiées. [(SERAYDARIAN (1953) (78)] .

L'acide désoxyribonucléique, sous l'influence du rayonnement ultra-violet, en présence de l'eau oxygénée, peut libérer successivement du phosphate, du désoxyribose, et des bases, l'ose et les bases pouvant être ultérieurement oxydés. Remarquons d'ailleurs que l'énergie qu'il faut dépenser pour rendre visibles ces modifications des acides nucléiques sous l'influence du rayonnement ultra-violet, est beaucoup plus grande que celle qui rend les cellules non viables; il faut penser, comme le font remarquer CHRISTENSEN et GIESE (12), que les microorganismes sont des récepteurs beaucoup plus sensibles que les photomètres.

L'énergie nécessaire pour tuer les microorganismes, toutes choses égales d'ailleurs, varie suivant les espèces considérées, ce qui montre bien que le phénomène n'est pas simple.

HOLLAENDER [(1942)(36)] montre que l'énergie requise pour tuer 90% des microorganismes exposés au rayonnement ultra-violet de longueur d'onde 2537 angströms, exprimée en ergs par mm² de surface de culture liquide irradiée, est de 452 pour le Bacille du charbon, 300 pour Esch. Coli, 180 à 300 pour divers staphylocoques; les spores de B. subtilis sont nettement plus résistantes, et il faut 1.200 ergs par mm² pour en tuer 90 %.

Que l'irradiation ultra-violette agisse sur les acides nucléiques in vivo, a été prouvé par divers

chercheurs; DE COURCY et coll. (14) montrent par exemple que des cellules du thymus du rat (thymocytes) irradiées libèrent dans le milieu extérieur de l'acide désoxyribonucléique dépolymérisé, tandis que celui resté intracellulaire ne paraît pas modifié.

Mais, de plus, l'irradiation ultra-violette agit sur la biosynthèse de l'acide désoxyribonucléique; KELNER [(1953) (44)] montre que chez *Esch. Coli*, la synthèse de l'acide désoxyribonucléique est complètement bloquée si l'irradiation a lieu pendant la phase de croissance, mais cette action n'est que temporaire et KANAZIR [(1954) (37)] note que l'acide thymidylique s'accumule dans ces conditions, sans doute parce qu'il n'est plus utilisé pour édifier l'acide désoxyribonucléique.

Par contre, la synthèse de l'acide ribonucléique n'est pas affectée par l'irradiation et, en phase de croissance logarithmique, cette synthèse reste proportionnelle à la multiplication cellulaire [(KANAZIR et ERRERA, 1953) (38)].

Par ailleurs, les rayons ultra-violets, à côté des Rayons X et de certains composés chimiques (moutarde à l'azote, sels d'uranium, etc..) sont des agents mutagènes: ils peuvent modifier, de façon héréditaire durable, certains caractères biologiques des microorganismes irradiés. Ces propriétés mutagènes ne s'exercent pas toujours dans toutes les conditions, sur tous les microorganismes, et Ph. LASSEUR et son école (49) n'ont pas obtenu de modifications nettes durables des caractères qu'ils ont testé chez *B. aurantiacus tingitanus*, après irradiation.

Les acides nucléiques - qu'il s'agisse de l'acide ribonucléique ou de l'acide désoxyribonucléique - irradiés par l'ultra-violet ne deviennent pas mutagènes de ce fait, ainsi que KAPLAN [(1953) (39)] l'a montré sur *Serratia marsescens*. Il semble donc probable que l'irradiation affecte surtout la synthèse d'un enzyme-enzyme que les acides nucléiques contribuent à élaborer - dont le spectre d'absorption serait, au moins en partie, analogue à celui de l'acide désoxyribonucléique.

Mais on peut aussi se demander si d'autres enzymes ne sont pas affectés dans leur fonctionnement ou dans leur synthèse, par suite de l'irradiation ultra-violette.

Et, si le secret de l'élaboration de ces enzymes réside dans les chromosomes, on peut admettre qu'une lésion d'un chromosome par l'irradiation ait comme conséquence un trouble métabolique héréditaire: formation de mutant ou de "saltant", au sens que NADSON (59) attribuait à ce mot.

SARACHECK et TOWNSEND [(1953)(74)] ont étudié le phénomène de plus près: dès que l'irradiation est suffisante pour tuer 99% des cellules, on note des modifications des mitochondries: gonflement ou raccourcissement, et même éclatement si l'irradiation se poursuit.

L'année suivante, SARACHECK[(72)(73)] apporte davantage de précisions: la survie des cellules après irradiation de levures est bien liée à sa teneur en acide désoxyribonucléique, mais celle-ci dépend de la phase du cycle mitotique dans laquelle la cellule se trouve au moment de l'irradiation et, éventuellement, de la répartition de l'acide désoxyribonucléique entre la cellule mère et le bourgeon.

L'idée que l'irradiation ultra-violette n'agirait sur les cellules que d'une manière univoque en lésant l'acide désoxyribonucléique ou les enzymes qui le synthétisent, est sans doute trop simple: elle impliquerait qu'il y a dans le noyau cellulaire un endroit (locus, cible, "target" des Anglo-Saxons) vulnérable et qui se trouve détruit lorsqu'une radiation le frappe avec une énergie suffisante.

HEINMETS et KATHAN (34) écrivent que la cellule est autre chose qu'une particule qui ne peut que vivre ou mourir; elle est complexe, et l'irradiation peut modifier bien des choses: les lésions peuvent être multiples et de degrés variables. Ainsi MARCHAL [(1947)(57)] avait déjà montré dans le cas de *B. pyocyaneus erythrogenes*, que les fonctions reproductrices sont atteintes avant la motilité, que les effets dépendent du stade évolutif auquel est parvenue la bactérie au moment de l'irradiation; plus récemment, KAPLAN [(1953)(39)] montre au contraire que *Esch. Coli*, rendu non viable par l'ultra-violet, garde sa capacité normale d'utiliser le glucose et de former des enzymes adaptatifs pour utiliser le galactose.

Cependant, l'existence de mutants biochimiques, isolables souvent en nombre important après irradiation ultra-violette de divers microorganismes, est actuellement incontestée: ce sont des cellules qui ne peuvent proliférer sur un milieu qui eût été suffisant pour la souche-mère, que si l'on y incorpore une ou plusieurs substances organiques; la souche-mère faisait la biosynthèse de ces molécules, mais l'irradiation a fait apparaître des cellules qui ont perdu ce pouvoir de synthèse et qui sont donc non viables si on ne leur fournit pas ces substances.

S'agit-il là de destruction, de pertes de gènes, ou plutôt, comme le suggère NEWCOMBE [(1952)(60)], de mutation de gènes? Y-a-t-il un ou plusieurs "locus" des chromosomes qui aient été touchés par le rayonnement? On peut admettre l'une et l'autre éventualité. Les transformations qui en résultent sont héréditaires et cependant guérissables [(LATARJET, 1944)(50)] en particulier par un simple séjour à la lumière visible [DULBECCO (1950)(16); KELNER (1952)(43) et (1953)(44)] ; [BENZER (1952)(6) et (1953)(7)]. DEAN et HINSHELWOOD (1951)(15), étudiant les effets de l'irradiation sur *B. lactis aerogenes*, ont pu isoler un nombre relativement élevé de mutants nutritionnels: chez certains mutants, incapables d'utiliser le saccharose, 12 enzymes distincts, au moins, manquent.

D'un autre côté, ALDOUS et STEWART [(1952)(2)] ont extrait divers enzymes de la levure de boulangerie, et ont comparé l'activité de ces enzymes, isolés respectivement à partir de cellules irradiées et de cellules normales; l'activité spécifique des enzymes a été rapportée, dans chaque cas, à 1 mg de l'azote contenu dans la préparation enzymatique. L'activité de la catalase, des deshydrogénases lactique et alcoolique est inchangée; l'activité de la zymase, de la carboxylase, de l'hexokinase, diminue avec l'intensité de l'irradiation (mortalité comprise entre 25 et 95%). L'activité de tous les enzymes est très fortement diminuée si le nombre de survivants n'est plus que de 2 ou 3 pour 100.000. In vivo, les enzymes sont bien moins sensibles aux ultra-violets, et l'activité de la catalase est même augmentée si l'irradiation ne fournit une mortalité que de 50 %.

La répétition des subcultures (20 à 60) rend aux cellules leur caractère primitif, soit qu'il y ait eu

mutation spontanée exactement inverse de la mutation originelle, soit qu'il y ait vraiment eu "guérison" des lésions causées par l'ultra-violet, lésions qui empêchaient la biosynthèse des enzymes. La guérison comporte le retour de l'acide désoxyribonucléique à son taux initial.

A l'heure actuelle SARACHECK [(1954)(72)(73)] pense que les 2 modifications les plus nettes produites par l'irradiation ultra-violette sont la rupture des chromosomes, et la mutation de certains caractères récessifs; elles impliquent l'absorption du rayonnement par l'acide désoxyribonucléique, mais elles ne peuvent être déduites de la cinétique de l'inactivation.

L'action de l'ultra-violet sur le fonctionnement de nombreux enzymes de la levure, a été étudiée, mais nous ne croyons pas qu'aient été choisis les enzymes qui aboutissent à la biosynthèse des stérols et que d'ailleurs on n'a pas encore isolés ni caractérisés: sans doute les industriels qui isolent l'ergostérol de la levure aux fins de le transformer en vitamine D₂ (ergocalciférol), ont-ils fait des expériences dans ce sens, mais nous n'en avons pas trouvé trace dans la littérature que nous avons consultée.

§ II.- TECHNIQUES D'IRRADIATION:

Ces techniques varient très largement suivant les divers auteurs. Pour obtenir les résultats attendus - altérations morphologiques, mutations, léthalité, - il semble que ce soit la quantité totale d'énergie reçue au cours d'une irradiation qui importe le plus: l'irradiation s'exprimera donc en ergs par unité de surface de la culture irradiée; la durée de l'exposition, la distance de la source à la culture, l'intensité de la source radiante peuvent être précisées, mais il paraît certain qu'on obtiendrait les mêmes effets, par exemple en prolongeant l'irradiation si la source est moins puissante. Par contre, la nature du rayonnement incident est d'une importance primordiale, et c'est au voisinage de la longueur d'onde

2.650 Å. que les rayons ultra-violet sont les plus actifs sur les micro-organismes.

La mesure de l'énergie reçue par unité de surface de la préparation microbienne irradiée, a pu être faite par des méthodes thermoélectriques [GATES (1920)(28)], par irradiation du salicylate de sodium, par emploi de cellules au sélénium sensibilisées à la willénite (silicate de zinc) [LATARJET (1953)(51)], par emploi d'oxalate d'uranyle [ALDOUS et STEWART, (1952)(2)] ou même par voie biologique, la sensibilité du coliphage T₂/B étant très constante et pouvant servir de référence [LATARJET et coll. (1953)(51)].

Dans nos recherches, nous n'avons pas cru utile de procéder nous-même à de telles mesures: ce qui nous importait était le résultat obtenu plutôt que l'étude analytique exacte des moyens mis en oeuvre, étant entendu que nous opérons toujours dans les mêmes conditions expérimentales.

NATURE de la SOURCE RADIANTE.

La nature des lampes qui sont utilisées comme source de rayonnement ultra-violet est également assez variée: STERILLAMP, WESTINGHOUSE, HANOVIA, GERMICIDE, MINERALLIGHT, HANAU, GALLOIS. Toutes les lampes semblent être établies pour que la majeure partie de l'émission soit constituée par la longueur d'onde 2.537 angströms, hautement germicide; la raie 1.849 angströms est généralement arrêtée par un verre spécial; la lumière visible et l'infra-rouge forment une partie d'autant plus importante du rayonnement, que la puissance de la lampe (1 à 15 W. généralement), est plus grande [LATARJET et coll. 1953 (51)]. La lumière visible étant capable de guérir des lésions apportées par l'ultra-violet, il y a intérêt à utiliser des sources dépourvues de radiations visibles: on cherche donc à exciter l'atome de mercure au niveau le plus bas, soit 4,87 eV, et les lampes peuvent donner jusqu'à 95% de leur rayonnement ultra-violet localisé à longueur d'onde 2.537 angströms, radiation de résonance correspondant à l'énergie fournie.

Nous avons dans notre étude employé une lampe GALLOIS en quartz: haute tension, basse pression, à vapeur de mercure, référence I25-25 (forme étrier) de puissance 1,8 W. Les électrodes peuvent supporter

un courant de 25 mA. D'après les constructeurs, une telle lampe, placée à 80 cm. de la surface à irradier, donnerait 72.000 ergs/cm²/minute pour la seule radiation 2.537 angströms; l'énergie du rayonnement variant de manière inversement proportionnelle au carré de la distance, il s'ensuit que, si la distance de la lampe à la culture à irradier n'est que de 25 cm, la puissance reçue est décuplée.

NATURE DES SOUCHES DE LEVURE ETUDIÉES

La levure que nous avons irradiée provient de l'isolement d'une colonie formée à partir d'un échantillon de levure basse de brasserie qui nous a été aimablement fourni par la Brasserie de Champigneulle (x).

Au cours de cet isolement, nous avons obtenu la souche attendue: *Saccharomyces cerevisiae* et, en plus, nous avons eu la surprise de voir apparaître une colonie rouge qui a été également prélevée et conservée sur le même milieu gélosé que *Saccharomyces cerevisiae*. Nous avons étudié cette levure rouge au Chapitre VI.

MILIEU DE CULTURE

Après avoir essayé divers milieux de culture, nous avons adopté le milieu suivant en raison du meilleur rendement en levure qu'il nous permettait d'obtenir:

Jus de levure	250 ml.
Saccharose	20 g.
Sulfate neutre d'ammonium	3 g.
Phosphate monopotassique	2 g.
Sulfate de magnésium	0,25 g.
Chlorure de calcium	0,25 g.
Chlorure de manganèse	0,001g.
Sulfate de zinc	0,001g.
Acide borique	0,001g.
Chlorure ferrique	0,0005g.
Sulfate de cuivre	0,0001g.
Iodure de Potassium	0,0001g.
Eau distillée	q.s.p. 1000 ml.

(x) Nous tenons à remercier ici Monsieur le Directeur du Service technique des Brasseries de Champigneulle, qui nous a toujours réservé le meilleur accueil.

tion donnée ci-dessus et nous le coulons dans les boîtes d'une façon stérile.

Nous avons été amené à garnir l'intérieur du couvercle des boîtes, avant leur stérilisation au four Pasteur, de papier filtre gris: en effet, nous étions obligé, dans les premières heures d'incubation à l'étuve, de placer les boîtes le couvercle au-dessus, et ce n'est qu'au bout de quelques heures d'étuve, lorsque la gélose avait absorbé complètement l'inoculum liquide, que nous les retournions; à ce moment-là, la vapeur d'eau se condensait sur le papier filtre et ne donnait donc pas de gouttes susceptibles de diluer les colonies.

Lorsque le milieu s'est solidifié, nous versons sur ce milieu de 0,1 à 0,5 ml. d'une dilution convenable de suspension de levures suivant la dimension de la boîte; nous nous arrangeons pour ensemençer environ 100 à 200 cellules par boîte en faisant varier le volume et la dilution de la suspension inoculée.

Ne disposant pas de boîtes de Pétri en quartz, nous enlevons le couvercle des boîtes pendant le temps nécessaire à l'irradiation.

Nous n'avons jamais agité les boîtes sous la lampe GALLOIS puisque la couche liquide était d'une épaisseur insuffisante pour arrêter notablement le rayonnement. L'irradiation se faisait dans une chambre noire, la lampe étant toujours allumée au moins 15 minutes d'avance de façon à lui permettre d'atteindre son régime normal.

Après quelques essais d'orientation, nous avons placé les boîtes de Pétri à 10 cm de la lampe et avons irradié de 2 à 3 minutes.

Nous faisons toujours de pair deux opérations identiques, l'une des boîtes ne devant pas être irradiée, mais servant de témoin. Après irradiation, les boîtes de Pétri irradiées et les boîtes témoins sont portées à l'étuve à 30° pendant 24 à 48 heures, suivant la vitesse d'apparition des colonies.

- C H A P I T R E I I -

=====

- ETUDE DU DOSAGE DES STEROLS DANS LA LEVURE -

- VARIATION DU TAUX DES STEROLS PAR RAPPORT AU

POIDS SEC.

§ I.- GENERALITES SUR LE ROLE DES STEROLS ET LEUR BIOSYNTHESE PAR LES MICROORGANISMES:

La présence de stérols dans la levure, et singulièrement d'ergostérol, a été reconnue depuis longtemps déjà; leur synthèse par les levures est évidente, puisque ces microorganismes peuvent se multiplier sur des milieux qui ne contiennent pas de stérols, et que l'on voit le poids des stérols après culture devenir bien plus considérable que celui des stérols contenu dans l'inoculum. Si la biosynthèse des stérols par la levure est donc certaine, le mécanisme de cette synthèse, par contre, est encore bien peu connu. Il est évident que la formation à partir de molécules simples d'une molécule relativement aussi compliquée que l'est celle de l'ergostérol, met en jeu un certain nombre d'intermédiaires et donc un nombre sans doute égal d'enzymes.

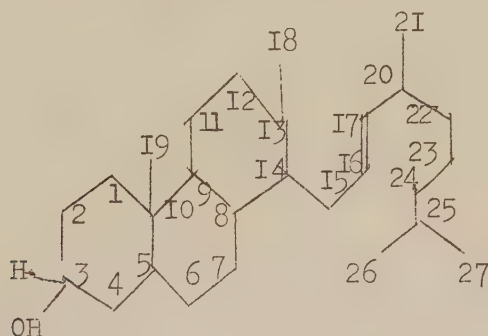
Les rayons ultra-violets altèrent les chromosomes, et partant, les gènes dont ils sont vecteurs: ils pourraient donc léser la région du chromosome où s'élaboreraient les molécules qui permettront au microorganisme de synthétiser un ou plusieurs des enzymes impliqués dans la biosynthèse des stérols.

Si une telle lésion avait lieu, et que la levure reste viable, la lésion devrait se traduire par une modification du taux des stérols: c'est pourquoi nous avons cherché à doser les stérols dans la souche-mère

d'une part, et dans la levure provenant de colonies irradiées, d'autre part, cultivées au même moment et dans les mêmes conditions.

Avant d'exposer notre technique analytique et nos résultats, nous voudrions rappeler brièvement quelques-unes de nos connaissances sur les stérols de la levure et sur le mécanisme de leur biosynthèse.

L'ergostérol, principal stérol de la levure, possède la formule développée suivante:



Il ne diffère du cholestérol, principal stérol des Mammifères, que par la présence en position 7-8 et en position 22-23, de deux doubles liaisons, ainsi que par la présence en 24 d'un radical méthyle supplémentaire.

A côté de l'ergostérol, on trouve dans la levure, différents autres stérols: le zymostérol, l'ascostérol, le fécostérol, le néostérol, le cerevistérol, l'épistérol, et l'hypostérol [d'après BREIVIK O.N., OWADES J.L. et LIGHT R.F. (9)]. Tous ces stérols donnent la réaction colorée de LIEBERMANN-BURCHARDT, dont nous parlerons plus loin en détail. Ils donnent tous également avec le digitonoside un complexe insoluble caractéristique.

Le mécanisme de la biosynthèse de l'ergostérol dans la levure est encore assez mal connu, et on est tenté de transposer au cas de la levure les connaissances acquises récemment sur la biosynthèse du cholestérol chez les Mammifères. Cette manière de voir est d'ailleurs renforcée par un très récent travail de SCHWENK (1954)(77) - que nous rappelons dans l'introduction - portant sur les

"compagnons" des stérols qui peuvent être isolés par chromatographie de l'insaponifiable de la levure. Si la levure est cultivée sur acétate marqué, ces "compagnons" sont eux aussi marqués; si on les extrait pour les faire ingérer par le rat, ils sont transformés par cet animal en cholestérol marqué. SCHWENK pense donc qu'il est vraisemblable que ces "compagnons" des stérols soient les précurseurs communs du cholestérol du rat et de l'ergostérol de la levure.

En 1937, SONDERHOFF et THOMAS ont montré que la levure au repos, placée dans un milieu contenant de l'acide acétique marqué par du deutérium (acide deutérioacétique) incorporait davantage de deutérium dans son insaponifiable (riche en stérols), que dans les lipides, protides ou glucides; ce travail suggérerait donc l'utilisation de l'acétate dans la synthèse de l'ergostérol. Parallèlement, les travaux de l'Ecole de SCHOENHEIMER ont montré, par utilisation d'eau lourde, que les animaux faisaient la synthèse du cholestérol à partir de petites molécules.

Plus récemment, OTTKE et coll. [(1950)(63)] ont apporté une preuve irréfutable de l'utilisation de l'acétate pour la formation d'ergostérol par les micro-organismes. Ils ont employé une variété de *Neurospora crassa* qui ne se développe que si on lui fournit de l'acide acétique, dont elle a donc perdu le pouvoir de faire la synthèse, même à partir du glucose. Ce *Neurospora* a été cultivé sur milieu glucosé additionné d'acétate doublement marqué $C^{14}H_3 - C^{14}OOH$. On sait que le marquage des molécules permet de suivre leur sort dans les organismes auxquels on les fournit. Dans les études sur les stérols, on marque certains atomes de carbone en substituant au carbone normal C^{12} des carbones lourds C^{13} et surtout C^{14} dont la radioactivité de très longue durée permet facilement le repérage. La concentration en isotopes dans l'ensemble de la matière vivante synthétisée était environ le tiers de la concentration existant dans le milieu de culture; mais la concentration de l'ergostérol en isotopes était la même que celle du milieu extérieur et l'analyse mathématique des chiffres donnés par le dosage montre que l'acétate fournit au moins 26 des 28 atomes de carbone que contient l'ergostérol.

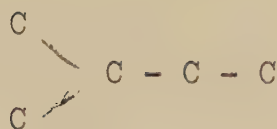
Les connaissances acquises récemment sur le métabolisme de l'acide acétique incitent à penser que le

Coenzyme A, le Coenzyme d'acétylation de LIPMANN, intervient dans la condensation de l'acide acétique en ergostérol. Un premier travail dû à KLEIN[(1951)(46)] en apporte déjà la preuve; des levures pauvres en acide pantothénique et donc en Coenzyme A, dont cette molécule est constitutive, ont été placées, au repos, dans un milieu contenant de l'acétate; la synthèse de l'ergostérol a été faible (0,6 mg) tandis que la même levure cultivée en présence d'acide pantothénique et d'acétate synthétise 4 mg. d'ergostérol, ces deux chiffres étant rapportés au même poids (1 g.) de levure sèche. Ce résultat suggère que la transformation de l'acétate en stérols, par la levure, est catalysée par le Coenzyme A. HANAHAN et WAKIL [(1952)(32)] dans des expériences analogues ont montré que la levure rendue déficiente en Coenzyme A ne contenait que des quantités négligeables d'ergostérol alors que la levure normale cultivée dans des conditions identiques en contenait 1 à 2 pour 1.000.

Par quel mécanisme, au moyen de quels corps intermédiaires, la levure transforme-t-elle l'acétate en stérols avec l'aide du Coenzyme A? A notre connaissance, aucun travail n'apporte de lumière directe sur cette question; c'est la biosynthèse du cholestérol chez les Mammifères qui a été seule étudiée à ce point de vue.

Il semble que pour synthétiser les stérols chez les êtres vivants, deux molécules d'acétate se condenseraient d'abord pour former de l'acétylacétate $\text{CH}_3\text{CocH.COOH}$. En effet, parmi les différents acides à 4 atomes de carbone essayés (acides butyrique, β hydroxy-butyrique, acétylacétique) ce dernier acide est le seul qui, incubé en présence de coupes de foie par exemple, donne naissance à du cholestérol nettement plus radioactif que ne le sont les lipides synthétisés en même temps; cela signifie que la molécule d'acétylacétate a été utilisée sans être préalablement dégradée en acétate, car l'acétate marqué donne naissance à des lipides de radioactivité comparable à celle du cholestérol.

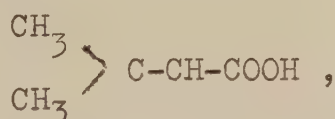
La possibilité d'assigner au cholestérol une structure polyisoprénique a conduit à penser que le stade suivant l'acétylacétate dans la synthèse, serait une molécule de type isoprénique:



De fait, l'acide isovalérique $\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \diagdown \\ \text{CH} - \text{CH}_2 - \text{COOH} \\ \diagup \\ \text{CH}_3 \end{array}$

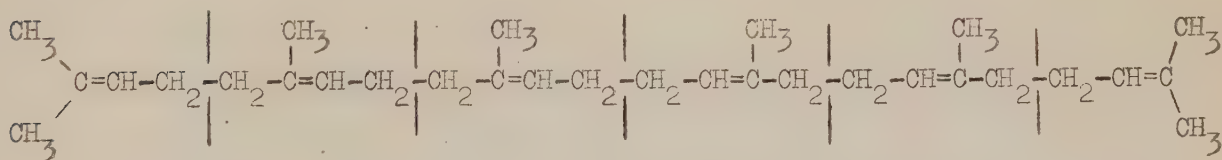
et son dérivé l'acide β -hydroxy- β -méthyl glutarique:

$\text{COOH} - \text{CH}_2 - \text{C} \begin{array}{c} \text{OH} \\ \diagup \\ \text{CH}_3 \end{array} - \text{CH}_2 - \text{COOH}$, et surtout l'acide $\beta\beta$ -diméthylcrotonique



peuvent être transformés en cholestérol par les coupes de foie et ont été caractérisés dans le liquide d'incubation de ces coupes en présence d'acétate.

On a émis l'hypothèse que ces molécules en C_5 , à structure isoprénique, s'accoleraient pour former du squalène. Cet hydrocarbure de formule brute $\text{C}_{30} \text{H}_{50}$ à la formule développée suivante:



Cette structure du squalène pourrait résulter de l'accolement de 6 groupements isopréniques. Les traits verticaux que nous avons fait figurer sur la formule représentative séparent les groupements isopréniques, constituants virtuels ou réels de la molécule. Or, le squalène, très abondant dans l'huile de foie des requins et autres poissons élasmodontes, est présent, en petites quantités chez les mammifères. On l'a isolé de l'insaponifiable du sébum, du cérumen, des cheveux; on l'a trouvé à l'état de traces et il n'a pu être mis en évidence dans le foie que grâce à des procédés spéciaux très délicats (emploi de squalène "entraîneur"). On a pu montrer que l'homme (un cancéreux) qui ingérait de l'acétate radioactif, élaborait du squalène radioactif

isolable dans le sébum, et que le squalène radioactif, administré à la souris, donnait naissance à du cholestérol radioactif. Il n'est cependant pas du tout certain que le squalène se transforme directement en cholestérol. L'opération serait d'ailleurs déjà assez compliquée puisqu'elle comporterait la disparition de 3 groupements méthyle, la fermeture de 4 cycles (par oxydation) et enfin la formation d'un hydroxyle alcoolique.

La formation d'ergostérol à partir du squalène semble plus aléatoire encore puisqu'il faut, en outre, fixer un radical méthyle en 24 et faire apparaître deux nouvelles double-liaisons (en 7 et en 22)°

Du squalène a bien été signalé dans l'insaponifiable de levure, dès 1936 par TAUFEL et coll. (81) en quantité relativement abondante (16,3 % de l'insaponifiable), ce qui paraît bien étonnant. Tout récemment, SCHWENK (1954) a pu isoler de très petites quantités de squalène à partir de la levure; par contre, les essais qui ont été faits au laboratoire dans lequel nous travaillions, n'ont pas permis de caractériser avec certitude du squalène dans l'insaponifiable extrait de plusieurs kilogrammes de levure fraîche.

On aurait pu penser que d'autres notions sur la biosynthèse des stérols seraient fournies par l'étude des conditions dans lesquelles cette synthèse est optimale; le problème, intéressant pour les industriels qui préparent le calciférol ou vitamine D₂, a été fréquemment abordé. HALDEN (31) en particulier, a indiqué que le traitement de la levure par la vapeur d'alcool en permettrait un notable enrichissement en stérols. Mais, à notre connaissance, cet ordre de recherche n'a amené aucun élément nouveau dans le problème qui nous intéresse.

Si la présence de stérols a été reconnue chez tous les êtres pluricellulaires, et la plupart des êtres monocellulaires, (font exception de nombreuses bactéries et quelques algues) le fait paraît certain que ces corps ne sont pas des constituants universels du protoplasme, et, comme la biologie des êtres dépourvus de stérols ne paraît pas foncièrement différente d'êtres voisins qui en contiennent, on est amené à penser que

leur rôle dans la cellule n'est peut-être pas primordial. D'ailleurs ce rôle est à l'heure actuelle à peu près inconnu. Chez les mammifères, le cholestérol est peut-être la source d'hormones et de vitamines; chez certains insectes, comme chez certains microorganismes, c'est un facteur de croissance, mais dans la levure, on ne s'explique pas le rôle des stérols.

Une notion nouvelle résulterait cependant des expériences d'ANDREASEN et STIER (1953)(3): l'ergostérol serait indispensable à la nutrition anaérobie des levures. Si ces résultats devaient se confirmer, ils ouvriraient une perspective nouvelle sur le rôle des stérols. Il y a quelques mois, KLEIN [(1954)(47)] n'a pas retrouvé de résultats aussi nets: la levure en anaérobiose stricte contient encore un taux notable de stérols que le passage en aérobiose peut cependant décupler. Cette divergence dans les résultats des deux groupes d'expérimentateurs peut d'ailleurs tenir au fait que les levures comme les milieux employés n'étaient pas identiques.

§ II.- TECHNIQUE DU DOSAGE DES STEROLS:

Nous voulions voir si la teneur en stérols de la levure était susceptible de se modifier sous l'influence du rayonnement ultra-violet; nous avons donc cherché à doser les stérols totaux sans nous préoccuper de la nature de chacun d'eux. Bien que la méthode par combinaison avec le digitonoside soit plus spécifique, nous avons préféré la méthode colorimétrique classique basée sur la réaction de LIEBERMANN-BURCHARDT en raison de sa commodité. D'autres auteurs préconisent le dosage de l'ergostérol par absorption ultra-violette au spectrophotomètre [(SHAW et JEFFERIES)(79)] .

La réaction de LIEBERMANN-BURCHARDT consiste à additionner une solution chloroformique de stérols d'un peu d'anhydride acétique et d'acide sulfurique concentré: la couleur du mélange évolue avec le temps, passant par un maximum et sa cinétique est très variable suivant les stérols mis en oeuvre.

Avec certains stérols, tel le lathostérol contenu

dans la peau, la réaction est très rapide et atteint son maximum au bout de une à deux minutes; au contraire, le cholestérol ne donne son maximum de coloration qu'en 10 à 30 minutes suivant les conditions expérimentales. En ce qui concerne les stérols extraits de la levure de bière, l'ergostérol donne un maximum d'intensité en 4 à 5 minutes, le zymostérol donne une coloration à peu près aussi rapidement, mais cette coloration est beaucoup plus fugace; elle est d'ailleurs à poids égal, 2,2 fois plus faible que celle donnée par l'ergostérol [(GALIMARD , 1934) (27)] .

Le dosage des stérols totaux de la levure comporte deux phases:

A - l'extraction

B - la réaction colorée proprement dite.

A.- Modes d'Extraction des Stérols de la Levure:

On était tout d'abord en droit de se demander s'il fallait employer la levure sèche ou humide comme matériel d'extraction. La dessiccation, et par conséquent la conservation de la levure, ne va-t-elle pas modifier la teneur en stérols ? BAK [(1939)(5)] l'affirmait, mais ses résultats ont été infirmés par la suite [(TRAININA)(82)] et nous-même n'avons pas trouvé de différences dans les dosages que nous avons faits sur la levure fraîche et sur la même levure séchée à condition de faire un séchage et une extraction convenables.

GALIMARD [(1934)(27)] dans une longue étude à ce sujet, constate, dans ses conditions expérimentales, que la levure desséchée cède ses stérols aux différents solvants employés, alors que la levure fraîche n'abandonne pas la totalité de ses stérols à l'acétone et au chloroforme. La levure sèche permettrait donc, selon lui, une meilleure extraction, et GALIMARD établit une technique consistant à dessécher la levure après l'avoir diluée au préalable dans une matière inerte très fine, la terre d'infusoires.

Dans la méthode que nous avons mise en oeuvre, nous avons préféré, par sécurité, employer la levure

lyophilisée: la poudre obtenue est bien plus rapidement épuisée et le matériel cellulaire se modifie au minimum si on a soin, comme nous le faisons, de lyophiliser la levure sitôt après sa récolte.

Nous opérons de la façon suivante: la culture de levure est centrifugée; le culot de centrifugation, d'abord congelé à 0°, est placé ensuite sur un verre de montre dans un exsiccateur, où, à l'aide d'une pompe à palettes Speedivac, est fait un vide poussé de l'ordre du centième de millimètre de mercure en présence d'anhydride phosphorique; on maintient le vide pendant plusieurs heures. L'humidité est ainsi totalement éliminée, et la levure desséchée peut être très facilement broyée, en une poudre extrêmement fine, au mortier d'agate. On laisse encore cette poudre dans l'exsiccateur sous vide, en présence d'anhydride phosphorique jusqu'à poids constant (pratiquement 24 à 48 heures). On pèse alors avec exactitude des prises d'essai de 50 à 100 mg. de cette poudre sèche, prête pour l'extraction.

I) Obtention d'une solution extractive des Stérols:

Aucun dosage de stérols ne peut se faire directement sur le matériel biologique brut: il faut en faire l'extraction par des solvants appropriés. Rappelons ici les principaux solvants des stérols et des stérides; ces corps sont très solubles dans le benzène, le chloroforme, le méthylal, l'éther de pétrole; moins solubles dans l'acétone; très peu solubles dans l'alcool froid, mais plus solubles dans l'alcool chaud [(d'après LOISELEUR)(55)] .

GALIMARD [(1934)(27)] avait - dans des extracteurs de Kumagawa - utilisé comparativement l'acétone, le chloroforme et l'alcool à 95c et il a donné la préférence au premier de ces corps.

MATHIEU [(1939)(58)] fait l'extraction des stérols de l'insecte *Péripleseta americana* par l'alcool absolu chaud pendant 5 heures à l'appareil de Kumagawa. Puis, dans le but de raccourcir l'extraction, il s'adresse également au méthylal, que CHARONNAT [(1936)(II)] avait indiqué comme excellent solvant du cholestérol et de ses esters.

REINARTZ [(1950)(66)] congèle la levure dans le gaz carbonique liquide additionné d'éther, puis ajoute un excès d'alcool et extrait à reflux. L'alcool est alors distillé; le résidu est traité à l'eau chaude, puis acidifié par l'acide sulfurique, et extrait par l'éther.

KINGSLEY et SCHAFFERT [(1949)(45)] font l'extraction directe au chloroforme, du cholestérol libre et total dans le sérum sanguin.

Enfin, KLEIN et LIPMANN [(1953)(48)] utilisent l'alcool méthylique à 75 %.

On voit donc que de nombreux solvants et de nombreuses techniques paraissent satisfaire ceux qui les emploient. Nous avons opéré - à l'instar de notre camarade de laboratoire, Jean VILLOUTREIX, qui a fait de nombreux essais -, l'extraction de la poudre sèche de levure, sans diluant, avec l'alcool méthylique pur desséché. L'opération se fait dans un appareil de Kumagawa pendant 8 heures; nous avons vérifié plusieurs fois, en pratiquant de nouveaux épuisements, que cette extraction de 8 heures était quantitative.

2) Purification de l'Extrait:

L'extrait méthylique, recueilli quantitativement dans un ballon, est distillé sur bain-marie électrique dans une atmosphère de gaz carbonique pour éviter les oxydations qui altèreraient les stérols, et le résidu est repris par une petite quantité de benzène bouillant qui dissout les stérols. Le ballon est rincé plusieurs fois avec de petites quantités de benzène. Les solutions benzéniques sont toutes réunies.

Le benzène utilisé doit être très pur, en particulier débarrassé de son thiophène qui fausserait la réaction de LIEBERMANN. Pour éliminer le thiophène, nous traitons le benzène pur du commerce par du nickel de Raney, récemment préparé, avec lequel le benzène est agité, à plusieurs reprises, 20 minutes dans un agitateur mécanique [(d'après VELLUZ-1951)(84)]. L'absence de thiophène dans le benzène ainsi traité était vérifiée par la réaction à l'isatine sulfurique: le thio-

phène donne, avec ce réactif, une coloration bleue-violette. Le benzène ainsi traité est filtré, séché sur sodium et ensuite redistillé.

L'extrait benzénique précédemment obtenu doit être débarrassé de substances qui fausseraient la réaction de Liebermann, et le mode opératoire que nous avons choisi, avec notre Camarade VILLOUTREIX, a consisté à mettre à profit la méthode chromatographique. Nous avons opéré avec des colonnes d'alumine Prolabo, pour chromatographie, purifiée selon SANNIÉ [(1937)(71)] : ébullition dans l'acide chlorhydrique, lavages et granulométrie par sédimentation sélective, séchage et réactivation pendant 2 heures et demie à 400° au four électrique. Les colonnes à chromatographie que nous avons employées avaient un diamètre de 1 cm, et étaient garnies de l'alumine, précédemment obtenue, sur une hauteur de 4 cm.

Pour l'élution sélective des stérols, nous avons employé le mélange benzène-méthanol 9/1. L'élution était toujours quantitative par utilisation de 20 à 30 ml. d'éluant.

Les solvants sont à nouveau évaporés sur bain-marie électrique dans une atmosphère de gaz carbonique, et le résidu est alors repris quantitativement par 5 ml. de chloroforme pur pour pratiquer la réaction colorée de LIEBERMANN.

B.- La Réaction colorée proprement dite:

De nombreux auteurs emploient la réaction colorée de LIEBERMANN-BURCHARDT que nous avons décrite ci-dessus.

L'influence des conditions expérimentales, et spécialement celle de la température, est extrêmement importante. KINGSLEY et SCHÄFFERT [(1949)(45)] l'ont démontré.

Pour éliminer toute cause d'erreur de cet ordre,

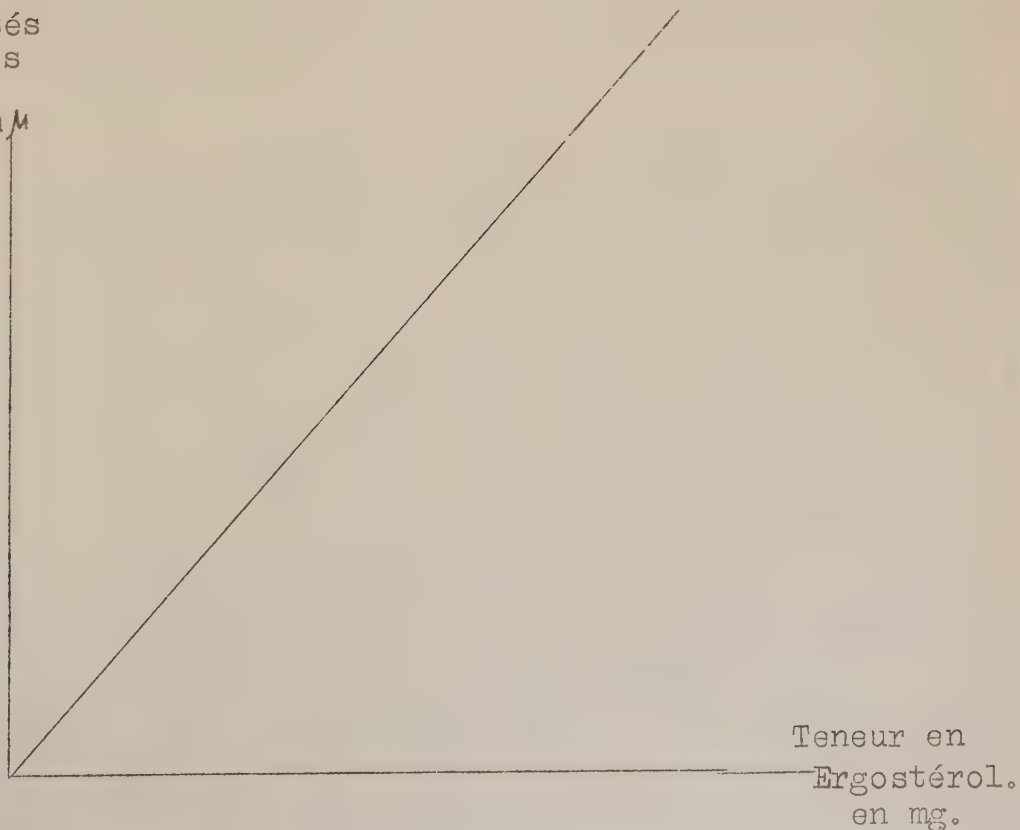
nous opérons à 0° exactement: l'extrait chloroformique et l'anhydride acétique étant placés un certain temps à l'avance, ainsi que le tube où se fera la lecture, dans la glace fondante. Nous avons vérifié, dans une étude sur la cinétique de la réaction, que celle-ci est stable de la 5^e à la 10^e minute, à 0°. La lecture est faite au spectrophotomètre COLEMAN à 625 m μ et les résultats en sont tirés par comparaison avec une courbe établie avec des solutions d'ergostérol de titres croissants. D'ailleurs, la loi de BEER-LAMBERT est respectée dans les limites des colorations que nous avons obtenues, ainsi qu'en témoigne le graphique ci-dessous:

L'ergostérol de référence que nous avons utilisé est l'ergostérol Roussel.

GRAPHIQUE MONTRANT LES VARIATIONS DE
DENSITES OPTIQUES EN FONCTION DE LA TENEUR
EN ERGOSTEROL

Densités
optiques

$\lambda = 625m\mu$



§ III.- RESULTATS EXPERIMENTAUX :

Tous nos dosages ont été effectués en double, c'est-à-dire sur deux prises d'essai différentes de la même levure lyophilisée; le chiffre que nous indiquons est la moyenne des deux valeurs obtenues. Si ces valeurs différaient notablement, ce qui n'est arrivé que rarement à partir du moment où nos techniques ont été bien établies, les chiffres n'étaient pas retenus. La divergence maxima que nous avons admise entre dosages comparatifs est de $\pm 7\%$; en général, cette divergence est inférieure à $\pm 5\%$.

A.- DOSAGES SUR LA SOUCHE-MERE NON IRRADIEE:

Nous avons opéré 24 dosages sur notre souche de levure-mère, dans les conditions suivantes: une culture sur le milieu que nous avons défini p.I2, âgée de 22 heures, et faite toujours dans les mêmes conditions, servait d'inoculum et 20 ml. en étaient versés, de façon stérile, dans un litre du même milieu; le tout était placé à l'étuve à 35° pendant des temps variables, compris, suivant les expériences, entre 15 et 46 heures.

Voici, classés par ordre croissant, et exprimés en milligrammes d'ergostérol par gramme de levure lyophilisée, les résultats que nous avons trouvés:

3,0	3,4	3,5					
4,0	4,2	4,4	4,5	4,6			
5,1	5,6	5,6	5,6	5,6	5,7	5,7	5,9
6,1	6,4	6,5	6,6	6,9	6,9		
8,2	8,3						

On voit aussitôt que la plupart des résultats sont compris entre 5 et 7 mg. par gramme; la moyenne arithmétique est 5,5 et l'écart type $\sqrt{\frac{\sum d^2}{n}} = 1,4$ c'est-à-dire qu'il y a 95 chances sur 100 pour qu'un nouveau dosage donne un chiffre compris entre 4,1 et 6,9 mg. par g.

Cependant, comme nos temps de culture avant dosage

ont été assez dissemblables, nous nous sommes demandé si ce facteur n'influencerait pas les valeurs que nous avons trouvées. Nous avons, en effet, opéré sur des cultures de 15 heures - prélevées par conséquent encore en pleine croissance - et aussi sur des cultures de 46 heures où la phase de croissance logarithmique était déjà terminée depuis peu:

- avec 6 cultures âgées de 15h, les chiffres trouvés ont été:

6,5 6,6 6,9 6,9 8,2 8,3

- avec 9 cultures d'âge compris entre 22 et 28 heures, nous avons obtenu les valeurs suivantes:

3,4 3,5 4,2 4,5 5,6 5,6 5,7 5,7 6,4

- des cultures, âgées respectivement de 36 et de 46 heures ont donné:

4,6 et 5,1.

Notons enfin que 7 des valeurs indiquées p.27 correspondent à des cultures dont nous n'avons pas exactement relevé l'âge.

Cet ensemble de valeurs montre qu'une culture jeune, âgée de 15 heures, est formée de levures plus riches en stérols qu'une culture plus âgée; en effet, la moyenne des 6 valeurs trouvées pour une culture de 15 h. est de 7,25 mg/g. sec; au contraire, les 11 valeurs trouvées pour les cultures plus âgées donnent une moyenne de 5,0 mg/g. et toutes les valeurs du second groupe sont inférieures à celles du premier.

Dans cet ensemble de chiffres, deux conclusions peuvent être tirées:

- 1) la teneur moyenne en stérols de la levure étudiée dans les conditions qui ont été précisées est $(5,5 \pm 1,4)$ mg. par g. sec.
- 2) la teneur en stérols, rapportée au gramme de levure sèche, est notablement plus forte (moyenne de 7,25 mg. par g. sec) pour une culture âgée de 15 h. que pour une culture plus âgée (22 à 46h) qui donne une moyenne de 5,0 mg. par g. sec.

B.- DOSAGES SUR LES LEVURES DESCENDANT DE SOUCHES
IRRADIEES:

Des dosages analogues ont été conduits sur des levures descendant de souches irradiées, avec l'espoir de déceler des levures dont la teneur en stérols serait très différente de la teneur de la souche normale analysée ci-avant.

L'ensemble de nos résultats d'irradiation n'est pas favorable à cet espoir bien que, à première vue, les résultats après irradiation donnent une valeur moyenne plus élevée qu'avant irradiation. Voici d'abord les valeurs trouvées pour chacune des 13 irradiations après lesquelles le dosage des stérols (rapporté en mg. par g. de levure sèche) a été pratiqué:

5,8		
6,0	6,6	
7,1	7,8	
8,2	8,5	8,8
9,2	9,4	9,4
10,4		
11,7		

La moyenne arithmétique de ces résultats est 8,4 et l'écart type 1,63. Comme, avec la levure non irradiée, nous avons obtenu la valeur $5,5 \pm 1,4$, nous pourrions en déduire que l'irradiation fournit des teneurs en stérols systématiquement plus élevées.

Nous croyons cependant devoir faire intervenir le temps de culture qui a précédé la récolte des échantillons; 10 échantillons sur 13 ont été récoltés après 15 h. de culture et fournissent une moyenne arithmétique de 7,85, l'écart-type étant $\pm 1,3$. Après culture de 15 h, la levure non irradiée nous donnait une valeur moyenne de $7,25 \pm 0,7$, ce qui montre que la différence entre ces deux groupes de valeurs ne peut être considérée comme significative.

Nous avons cependant voulu analyser le phénomène de plus près et avons comparé la teneur en stérols de

deux cultures faites simultanément, à partir d'une même souche, et ayant subi exactement les mêmes traitements, à cela près qu'une suspension avait été irradiée pendant 2 ou 3 minutes, l'autre suspension restant pendant le même temps dans une boîte de Pétri témoin (Cf. p.I4)

Les résultats obtenus figurent dans le tableau N° I.

- TABLEAU N° I -

Effets d'une irradiation de 2 minutes sur la teneur de la levure en stérols (après 15 h. de culture)

N° de l'essai	Stérols (en mg)/g.levure lyophilisée)		Variation de la teneur en stérols par irradiation.
	Avant irradiation	Après irradiation	
3	6,6	9,4	+ 40 %
4	8,3	5,8	- 30 %
5	8,2	6,0	- 25 %
6	6,5	7,1	+ 10 %
7	6,9	7,8	+ 13 %

Ce tableau montre clairement que l'irradiation n'apporte pas de modifications nettes ni univoques du taux de stérols dans la levure.

Nous avons alors cherché s'il était possible de faire supporter à la levure une irradiation plus prolongée et si celle-ci amènerait des résultats plus nets quant à la teneur en stérols. Une seule suspension de levures a supporté une irradiation de trois minutes (au lieu de deux minutes habituellement), encore deux colonies seulement se sont-elles développées. La croissance a d'ailleurs été plus lente et il a fallu attendre 24 h. pour obtenir une suspension de levures dont la densité optique soit du même ordre que celui

fourni, en 15 h, par les cellules irradiées deux minutes seulement. Le dosage de stérols effectué sur les levures provenant d'une irradiation de 3 minutes a donné la valeur 8,5 mg. par g., alors que la souche-mère (n° 3) avait donné 6,6 mg. par g. et que la levure provenant d'une irradiation de 2 minutes seulement avait donné 9,4 mg.

Ainsi, la seule expérience d'irradiation plus prolongée que nous ayons pu réaliser, n'a pas apporté de variations notables de la teneur en stérols.

Nous avons aussi cherché à obtenir les modifications souhaitées en irradiant à plusieurs reprises une même levure. Une suspension de levure (souche mère) a été irradiée 30 secondes et n'a alors donné que deux colonies; l'une de ces colonies a servi à obtenir une culture en milieu liquide dont une goutte a été étalée sur milieu solide et conservée une dizaine de jours à la glacière. Inoculée alors sur milieu liquide, elle a fourni une suspension qui a été irradiée 30 secondes et on a alors obtenu une seule colonie que nous avons appelée P₂. Deux autres traitements analogues ont été pratiqués qui nous ont livré successivement des suspensions P₃ et P₄. Le dosage des stérols a été effectué dans cette dernière et a fourni, après 24 h. de culture (la croissance a donc été relativement lente) un taux de stérols de 10,4 mg. par g. sec. Cette valeur est sensiblement plus élevée que les valeurs trouvées lorsqu'il n'y a pas eu irradiation ou lorsque l'irradiation est unique; néanmoins, la variation constatée n'est pas très considérable. Aussi, avons-nous cherché à aller plus loin encore dans la répétition des irradiations et la souche P₄ a encore été irradiée, plusieurs mois après, et a fourni, après deux minutes d'irradiation, des cellules, P₅ qui, irradiées une fois encore pendant deux minutes, ont permis d'obtenir des levures P₆; celles-ci, irradiées deux minutes, ne laissent plus se développer de colonies. La teneur en stérols de la levure P₆ a été de 11,7 mg. par g. sec; le développement de la culture avait été plus lent et la récolte n'a pu être faite qu'au bout de 36 h. Examinées au microscope, ces levures P₆ ont un aspect tout-à-fait anormal: elles sont, dans l'ensemble, plus grosses, avec de nombreuses vacuoles; les formes bourgeonnantes abondent et le bourgeon est tubulaire.

En résumé, une irradiation unique d'une suspension de levures ne modifie pas nettement le taux des stérols des levures qui en sont issues. Des irradiations répétées sur des cultures successives obtenues à partir d'une même colonie initiale ont donné des teneurs en stérols nettement supérieures à la normale, 10 ou 11 mg. par g. sec, au lieu de 7. Cependant, nous n'avons pu obtenir par irradiation aucune levure dont la teneur en stérols soit très nettement élevée.

o
o o

- C H A P I T R E I I I -

=====

ETUDE DE LA TENEUR MOYENNE D'UNE CELLULE EN STEROLS

VARIATIONS NORMALES ET VARIATIONS CONSECUTIVES
A L'IRRADIATION ULTRA-VIOLETTE

-

Les variations spontanées de la teneur de la levure en stérols ne paraissent pas - nous l'avons vu - très différentes des variations notées sous l'influence de l'irradiation ultra-violette. On peut se demander alors si ce résultat ne provient pas d'une mauvaise interprétation des valeurs numériques: nous avons jusqu'ici rapporté nos résultats au poids sec de levure après culture; or, il ne nous paraît pas déraisonnable d'imaginer que la quantité de stérols contenue dans une cellule soit, au moins dans certaines circonstances, une grandeur relativement constante. Il est possible que la biosynthèse des stérols ne soit vraiment active qu'à un moment déterminé de la vie cellulaire, par exemple au moment du bourgeonnement, afin de doter la cellule naissante de la quantité nécessaire de ces corps. On comprendrait dans ces conditions que le rapport des stérols au poids de levure sèche ne puisse être constant; par contre, le poids de stérols par cellule le serait. On peut aussi penser que les stérols, corps tensio-actifs, se rassemblent à la périphérie des cellules et que la teneur en stérols, rapportée à la surface cellulaire, serait plus intéressante à étudier; mais nous ne connaissons aucun moyen d'estimer la surface des cellules de levure dans un milieu de culture.

Pour déterminer le poids moyen de stérols par cellule, nous avons dû opérer indirectement et déterminer, d'une part, le rapport des stérols au poids de

la levure sèche (comme nous l'avons décrit dans le Chap.II) et, d'autre part, le nombre de cellules contenu par gramme de levure sèche; le quotient de ces deux rapports fournit bien la grandeur cherchée: poids de stérols par cellule.

Une grosse difficulté, qui existe dans toute numération portant sur les levures, provient du bourgeonnement. Une cellule qui porte un bourgeon doit-elle être comptée pour une cellule unique ou pour deux cellules? La réponse pourrait être donnée si on savait à quel moment se fait la synthèse des stérols et si l'on pouvait obtenir une suspension de cellules pratiquement non bourgeonnantes, suspension où certaines influences feraient éclore, à volonté, un grand nombre de bourgeons. Certains auteurs prétendent avoir atteint ce but. SARA-CHECK [(1953)(74)] fait une suspension concentrée de levure de boulangerie du commerce et, laissant cette suspension en anaérobiose, n'y rencontre que peu de cellules bourgeonnantes. Le passage à l'aérobiose rend, au bout de quelques heures, 80 % des cellules porteuses de bourgeons. Nous n'avons pu reproduire ces résultats malgré plusieurs tentatives. Nous en avons donc été réduit à analyser avec soin le bourgeonnement des suspensions dont nous faisons l'étude; et à faire, somme toute, trois numérations sur la même préparation:

- a) numération conventionnelle où l'on compte comme cellule entière le bourgeon dont le grand axe atteint au moins le quart de celui de la cellule-mère.
- b) numération des cellules dépourvues de tout bourgeon visible.
- c) numération des seules cellules portant un bourgeon visible.

Ces trois dénombrements sont faits sur une même suspension de levure placée dans l'hématimètre de Malassez. On verra, d'après les chiffres qui figurent au tableau n° 4, p. 39, que si l'on compte les cellules bourgeonnées pour deux cellules et que l'on ajoute ce nombre à celui des cellules non-bourgeonnées, on trouve bien un total qui se rapproche de celui fourni par la numération conventionnelle.

§ I.- TECHNIQUE de la NUMERATION:

La suspension de levure est centrifugée 10 minutes à 3.500 tours et à 0° (centrifugeuse Jouan C.53); le culot est lavé à deux reprises à l'eau distillée, puis pesé. Son poids (humide) oscille entre 2 et 9 grammes suivant les expériences. Le culot est remis en suspension dans 200 ml. d'eau distillée et agité mécaniquement pendant 1/2 h.

Une première prise d'essai de 10 ml. est placée dans un cristalliseur taré; l'eau est évaporée au bain-marie bouillant, le résidu repris par de l'alcool à 95°, l'alcool chassé au bain-marie et le cristalliseur porté à l'étuve à 105° jusqu'à poids constant (12h. en général).

Une autre prise d'essai sera utilisée pour faire la numération des levures; on emploie le mélangeur de Potain pour globules blancs et on réalise ainsi une dilution au 1/20.

Nous avons voulu nous assurer de la rigueur de nos déterminations en voyant si les mesures étaient reproductibles: pour cela, il fallait retrouver avec un minimum de précision - que l'on peut chiffrer à + (5%) (1)- les mêmes valeurs pour deux numérations parallèles faites sur la même suspension cellulaire. Pour cela, il fallait obtenir une suspension très homogène et assez stable pour que la sédimentation ne soit pas notable au cours des mesures. Tout au début de ces recherches, nous utilisions, pour effectuer la dilution, les pipettes ordinaires, mais les suspensions de levure se sédimentant avec grande facilité, cela occasionnait de grosses erreurs. L'emploi de pipettes dites mélangeurs de Potain nous a donné satisfaction, à condition d'augmenter la viscosité du milieu de dilution; nous avons alors additionné le soluté chlorurosodique servant à la dilution de diverses quantités de gélose et nous nous sommes arrêtés à la formule suivante qui nous a donné satisfaction:

Chlorure de Sodium	9 g.
Gélose	0,25 g.
Eau distillée	q.s.p. 1000 ml.

(1) C'est le degré de précision que SLONIMSKI (79 bis) assigne aux numérations systématiques qu'il a faites sur la levure.

La numération se fait sur 10 champs de chacun 25 rectangles, la répartition des levures y étant assez homogène, comme le prouvent les valeurs ci-dessous qui proviennent d'une numération prise au hasard:

II8 - IO8 - II8 - II9 - I25 - I24 - I22 - III - 99 - II6.

Moyenne: II6.

Nous avons toujours pratiqué au moins deux numérations comparatives sur la même suspension de levure; lorsque nos chiffres différaient de plus de 5% - ce qui était rare - nous pratiquions une ou deux numérations supplémentaires.

§ - RESULTATS EXPERIMENTAUX :

A.- TENEUR en STEROLS d'une CELLULE de LEVURE NON IRRADIEE:

Nous indiquerons d'abord les résultats obtenus avec la levure non irradiée. Dans le tableau suivant, figurent la teneur d'une cellule de levure en stérols, ainsi que les éléments qui nous ont permis de la déterminer, à savoir: dans la colonne I, le poids de levure, exprimé en mg., contenu dans 1 ml. de la suspension qui servira à faire la numération (colonne 2); le quotient de ces deux nombres fournit le poids d'une cellule; (colonne 3); celui-ci, multiplié par la teneur en stérols d'un g. de poudre lyophilisée (colonne 4), obtenu comme il a été indiqué au Chapitre II, fournit le chiffre cherché qui se trouve dans la colonne 5. Dans le tableau suivant, les valeurs de cette dernière colonne ont été rangées par ordre croissant.

- TABLEAU N° 2 -

- TENEUR CALCULEE D'UNE CELLULE DE LEVURE EN STEROLS -
(en mg x 10⁻¹¹)

N° de l'essai	Extrait sec de 1 ml. de suspension en mg. (1)	Nombre de cellules par mm ³ (2)	Poids d'une cellule en mg. x 10 ⁻⁸ (3)	Sterols en mg./g. de subst. sèche (4)	Sterols par cellule en mg. x 10 ⁻¹¹ (5)
1	4,25	232.000	1,8	4,6	8,3
7	2,03	135.600	1,5	6,9	10,4
4	5,76	325.600	1,8	8,3	14,9
6	3,20	137.600	2,3	6,5	15,0
3	7,84	305.600	2,6	6,6	17,1
2	8,39	332.400	2,5	6,9	17,2
5	5,17	236.000	2,2	8,2	18,0

La moyenne arithmétique de la teneur d'une cellule en stérols est de 14,5. 10⁻¹¹ mg. et l'écart-type + 3,5. En examinant les chiffres extrêmes, on s'aperçoit que la teneur peut varier du simple au double, mais, dans l'ensemble, les résultats montrent que les cellules les plus lourdes sont plus riches en stérols; cela résulte de la comparaison des colonnes 3 et 5: les trois premières lignes sont celles où les cellules sont à la fois les plus légères et où la teneur en stérols par cellule est la plus faible.

Ce résultat s'accorde mal avec l'idée que le bourgeon recevrait, dès sa naissance, la quantité de stérols qui lui est nécessaire, ce que la réalité d'une biosynthèse continue semblait déjà exclure. On peut alors se demander dans quelle mesure la numération conventionnelle dont les résultats sont indiqués dans la colonne 2 - est à prendre en considération. Si le bourgeon est pauvre en stérols, peut-être ne devrait-on pas le compter

pour une cellule? Ainsi les résultats pourraient être plus nets si on les rapportait au chiffre total des cellules adultes - chiffre obtenu en additionnant les cellules sans bourgeon et celles avec bourgeon adhérent quelle qu'en soit la taille. (Notons que dans la numération conventionnelle, une levure bourgeonnante est comptée pour deux cellules si le bourgeon atteint le quart de la taille de la cellule-mère).

Le Tableau n° 3 indique les valeurs des numérations faites sans tenir compte des bourgeons; la teneur d'une cellule en stérols a été calculée de la façon déjà indiquée ci-dessus.

- TABLEAU N° 3 -

- TENEUR D'UNE CELLULE EN STEROLS, SANS TENIR COMPTE
DES BOURGEONS -

N° de l'essai	Nombre de cellules sans compter les bourgeons	Stérols par cellule en mg. x 10 ⁻¹¹
I	200.000	9,7
7	125.400	11,2
6	128.000	16,2
4	284.200	16,6
5	223.200	19,0
3	267.200	19,8
2	269.000	21,5

La moyenne arithmétique, qui est 16, n'est donc pas sensiblement augmentée; ce tableau confirme seulement que les cellules les plus grosses (voir le Tableau n° 2) sont aussi les plus riches en stérols.

Nous avons également voulu réunir les chiffres donnés respectivement - pour les 7 essais précédents - :

- 1°/ par la numération dite "conventionnelle",
2°/ par la numération des cellules sans bourgeon,
3°/ enfin, par la numération des cellules portant un bourgeon visible.

Si, dans le tableau ci-dessous, l'on additionne le chiffre de la colonne 2 au double de celui de la colonne 3, on retrouve - approximativement - dans la colonne 4, le chiffre de la numération conventionnelle.

- TABLEAU N° 4 -

N° de l'essai.	Nbre de cellules par mm ³ Numération conventionnelle.	Nbre de cellules non bourgeonnées par mm ³	Nbre de cellules bourgeonnées par mm ³	Total
	(1)	(2)	(3)	(4)
1	232.000	168.800	31.200	231.200
2	332.400	194.400	74.400	343.200
3	305.600	227.000	40.200	307.400
4	325.600	241.600	42.600	326.800
5	236.000	199.000	24.200	247.400
6	137.600	114.000	14.000	142.000
7	135.600	115.400	10.000	135.400

B.- TENEUR EN STEROLS D'UNE CELLULE de LEVURE DESCENDANT de SOUCHES IRRADIEES :

Nous avons refait les mêmes dosages sur des levures provenant de souches irradiées:

./.

- TABLEAU N° 5 -

TENEUR CALCULÉE D'UNE CELLULE de LEVURE en STEROLS
(en mg. 10×10^{-11}) après IRRADIATION.

N° de l'essai.	Extrait sec de 1 ml. de suspension en mg.	Nbre de cellules par mm ³	Poids d'une cellule en mg. $\times 10^{-8}$	Stérols en mg./g. de substance sèche	Stérols par cellule en mg. $\times 10^{-11}$
	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)
5	4,04	226.000	1,7	6,0	10,7
4	5,00	256.400	1,9	5,8	11,3
10	4,80	234.800	2,0	6,6	13,5
8	3,18	154.200	2,1	8,2	17,2
6	5,08	207.000	2,4	7,1	17,4
3	5,86	262.400	2,2	9,4	21.
7	3,76	124.800	3,0	7,8	24,1
9	4,86	172.400	2,8	9,4	26,5

On a rangé par ordre croissant les poids de stérols par cellule.

La moyenne générale est de 17,7 mg. 10^{-11} de stérols par cellule, et l'écart-type est de ± 5 ; avec la levure non irradiée, nous avons trouvé la valeur moyenne $14,5 \pm 3,5$; la moyenne des chiffres fournis par la levure irradiée est un peu supérieure à celle fournie par la levure non irradiée; mais la différence n'est pas vraiment significative, d'autant plus que nous avons fait figurer dans le tableau n° 5, trois valeurs (essais n° 8, 9 et 10) pour lesquelles nous n'avons pas à mettre en regard la teneur en stérols de la souche non irradiée; si l'on ne tient pas compte de ces trois valeurs pour rendre les résultats de l'irradiation plus comparables à ceux de la levure de même souche - mais qui n'a pas subi d'irradiation - la moyenne de la teneur d'une cellule en stérols passe de 17,6 à 17, l'écart-type

ne se modifiant qu'à peine; cela confirme que l'irradiation ne change pas sensiblement la teneur d'une levure en stérols. Le fait est encore plus net si nous confrontons les résultats fournis par un même essai:

- TABLEAU N° 6 -

N° de l'essai	Stérols par cellule en mg. X 10^{-11}		Variation sous l'influence de l'irradiation
	Avant irradiation	Après irradiation	
3	17,1	21	+ 23 %
4	14,7	11,3	- 23 %
5	17,9	10,8	- 40 %
6	15	17,4	+ 15 %
7	11,8	24,2	+105 %

Tous les résultats précédents ont été fournis par des irradiations de 2 minutes. Nous avons pu, une seule fois, obtenir deux colonies après 3 minutes d'irradiation; la teneur en stérols par cellule s'en trouve nettement augmentée: 25,5. 10^{-11} mg. au lieu de 21, lorsque l'irradiation n'était que de 2 minutes et 17, lorsqu'il n'y a pas d'irradiation.

Enfin, une souche a été irradiée "en cascades", ainsi que nous l'avons décrit Chapitre II, p. 31. Après le 4^e traitement, nous avons eu la valeur 32,6 et au 6^e, la valeur 35,2 mg. 10^{-11} par cellule.

Nous ne rapportons pas ici - comme nous l'avons fait pour les levures irradiées - les valeurs calculées sans tenir compte des bourgeons; en effet, le nombre des bourgeons a toujours été relativement faible dans ces essais (6 à 13%) : l'estimation de la teneur en stérols d'une cellule de levure ne peut donc s'en trouver nettement affectée.

Au total, par irradiation unique, nous ne sommes pas arrivés à obtenir une levure qui soit enrichie ou appauvrie en stérols d'une manière significative; par irradiations répétées cependant, la teneur en stérols - qu'elle soit exprimée par rapport au poids sec ou par rapport à une cellule - peut augmenter notablement; mais en même temps, la levure se cultive moins aisément et son aspect est fortement modifié.

o
o o

- C H A P I T R E I V -

=====

- ETUDE DU RAPPORT STEROLS / AZOTE TOTAL DANS LA LEVURE -
SES MODIFICATIONS APRES IRRADIATION PAR LE RAYONNEMENT
ULTRA-VIOLET.

-

Dans les deux chapitres précédents, les dosages de stérols étaient rapportés soit au poids sec de levure, soit à une cellule moyenne; les grandes divergences de nos résultats nous ont incité à réfléchir sur ces modes d'expression: ne s'en trouve-t-il pas un autre mieux adapté à nos recherches? En effet, dans un poids donné de microorganismes secs, comme dans un nombre résultant d'une numération, les cellules mortes interviennent au même titre que les cellules vivantes, ce qui peut être critiquable. Mais pour nous, cette manière de faire ne présente pas d'inconvénients car les cellules mortes avaient dû, elles aussi, élaborer des stérols dans les mêmes conditions que celles qui étaient encore en vie à la fin de la culture.

Par contre, rapporter les stérols au poids de levure sèche présente, nous semble-t-il, le défaut de mettre sur le même plan la substance physiologique active et les substances de réserve. Or, dans la levure, les substances de réserve atteignent des taux fort variables; ainsi, les modifications du glycogène dans une levure, ensemencée sur milieu sucré, ont été notées par URION (83), qui a minutieusement analysé ses variations: constitution rapide d'un stock, disparition de ce stock au début de la fermentation; nouveau stockage quand la fermentation est ralentie par l'accumulation d'alcool. On conçoit que la présence d'une quantité plus ou moins forte de glycogène de réserve n'ait aucune influence directe sur la teneur de la levure en stérols: il est donc plus logique de rapporter la valeur des stérols au poids de la cellule privée de ses réserves et il nous a semblé que la meilleure manière d'aboutir était de rapporter nos résultats à la teneur

en azote total.

On sait que, dans les microorganismes, presque tout l'azote se trouve sous forme active (enzymes, peptides et acides aminés) et cette grandeur est facile à déterminer. On l'a souvent utilisée pour en déduire le poids de la matière organisée, mais les variations que l'on trouve dans les dosages faits sur une même espèce microbienne montrent bien que ce test n'est pas toujours satisfaisant lorsqu'on l'emploie dans ce but. RONCHESE (A.M.) (69) donne, pour une même espèce microbienne (Staphylocoque blanc), les valeurs de 9,2 - 10,8 - 11,6 %. Des variations aussi considérables s'expliqueraient si, à côté de la substance active - dont la teneur en azote serait assez constante - il y avait, dans le microorganisme, des poids variables de substances de réserve; c'est pourquoi il n'était sans doute pas sans intérêt d'essayer de voir si les variations de la teneur en stérols étaient liées à la substance proprement vivante de la cellule, à ses protides.

La teneur en protides d'une cellule peut se mesurer, au moins approximativement, par sa teneur en azote total. C'est pourquoi nous avons déterminé le rapport stérols/azote total. Si ce rapport était sensiblement constant chez la cellule normale, cela présagerait que la synthèse des stérols est parallèle à la croissance cellulaire. Si l'irradiation amenait des modifications notables de ce rapport, on aurait ainsi mis le doigt sur une altération des processus métaboliques dont les modalités pourraient être étudiées de plus près.

§ I.- TECHNIQUE DU DOSAGE DE L'AZOTE TOTAL:

La levure est recueillie par centrifugation à 0°; on lave le culot à deux reprises à l'eau distillée glacée, de manière à éliminer rigoureusement toutes les substances azotées provenant du milieu de culture. Le culot est ensuite remis en suspension dans un certain volume d'eau distillée que l'on complète en général à 200 ml. De cette suspension - rendue parfaitement homogène, par agitation mécanique, d'abord, puis par agitation à la main au moment même du prélèvement - on

mesure aussi rapidement que possible un volume exact (5 ml. en général) pour le dosage de l'azote.

Ce volume est introduit dans un ballon de Kjeldahl; on y ajoute 3 ml. d'acide sulfurique pur et environ 0,1 g. du catalyseur de DUMAZERT (17). On minéralise au bain de sable jusqu'à décoloration totale de la liqueur et on poursuit, par sécurité, la chauffe pendant quelques heures encore; au total, l'opération dure environ 5 h. Ensuite, on transvase quantitativement le contenu du Kjeldahl dans un ballon jaugé de 50 ml., on complète à ce volume avec de l'eau distillée et on dosera l'azote total dans des prises d'essai aliquotes par déplacement de l'ammoniaque et titrage volumétrique par l'acide sulfurique N/100 dans l'appareil de PARNAS et WAGNER, modifié par LEVY et SAPIR (54). Nous avons employé comme indicateur du virage l'alizarine sulfonate de sodium sensibilisé.

Il est nécessaire de rapporter le résultat du poids d'azote au poids sec de levure; on fait donc - dans les mêmes conditions expérimentales que celles indiquées dans le Chapitre III (Cf. p.35) - la détermination de l'extrait sec.

Les dosages d'azote total faits en double nous ont donné des résultats parfaitement comparables; l'erreur relative commise expérimentalement est de $\pm 1 \%$.

Les deux rapports: azote total/cellule et stérols/cellule nous permettront de calculer le rapport cherché stérols/azote total, en divisant le deuxième par le premier.

§ II.- RESULTATS EXPERIMENTAUX:

Le rapport azote total/poids de levure sèche a donné, comme il fallait s'y attendre, des résultats très variables.

Avec la levure normale, les chiffres obtenus ont été exprimés en mg. par g. de levure lyophilisée:

60,7	68,3	69,3						
70,0	76,0	77,3	78,4	79,9				
82,7	83,3	83,9	84,5	85,7	85,9	86,1	87,2	87,5
					87,5	88,4	89,2	89,4
90,0	90,4	90,9	91,0	93,0	93,5	93,6	94,2	94,3
					94,8	96,8	97,5	

Moyenne arithmétique: 87 mg. par g. de levure lyophilisée.

Avec la levure irradiée, les chiffres obtenus ont été:

66,2					
76,7					
80,7	80,7	83,7	88,0	89,0	89,2
99,6					
100,0	102,5				
112,0					

Moyenne arithmétique: 80 mg. par g. de levure lyophilisée.

L'irradiation ne modifie donc pas sensiblement le rapport azote total/poids sec, et nous n'avons pas isolé de levures où ce rapport aurait été profondément perturbé.

Nous avons calculé la teneur en azote total d'une cellule en faisant les mêmes déterminations que pour les stérols (voir Ch. III, p.36). Ce rapport, joint au poids de stérols par cellule, nous a alors permis d'établir le rapport stérols/azote total.

Voici les valeurs calculées pour la levure normale, tous ces chiffres étant multipliés par 1000:

./.

39					
44	48				
51	52	58	58	59	59
61	62	62	66	67	
70	75	75	77		
84					
95	96	97			

Moyenne arithmétique: 66.

Ecart type: $\pm$ 16.

Pour la levure irradiée, les rapports stérols/azote total ont été respectivement (tous ces chiffres étant multipliés par 1.000) :

54	91	107
66	92	114
71	102	129
87	102	130

Moyenne arithmétique: 95.

Ecart type : $\pm$ 22,7.

A ne considérer que les moyennes, il semblerait que l'irradiation ait augmenté le rapport stérols/azote total; mais les variations individuelles sont si fortes que la différence notée entre la levure normale et la levure irradiée est sans signification, d'autant plus que l'erreur expérimentale est forte.

Cette conclusion est confirmée par l'examen comparatif de la valeur du rapport en question dans une souche normale et dans la même souche après irradiation, ainsi qu'il résulte du tableau suivant:

- TABLEAU N° 7 -

- VARIATIONS DU RAPPORT STEROLS/AZOTE TOTAL
CONSECUTIVES A L'IRRADIATION.

N° de l'essai	Rapport Stérol/Azote total		Variation sous l'influence de l'irradiation
	Avant irradiation	Après irradiation	
3	95	107	+ 12 %
4	96	87	- 10 %
5	97	54	- 42 %
6	75	71	- 5 %
7	75	102	+ 34 %

Les cellules issues de la levure irradiée - comparées à celles dont elles dérivent- ont donc des rapports stérols/azote total qui ne varient pas d'une façon systématique.

C'est encore dans la levure irradiée en cascade que le rapport stérols/azote total est le plus élevé: I30 - ce que la forte teneur en stérols explique.

En résumé, aucun rapport n'apparaît entre la teneur de la levure en stérols et son poids de protides mesuré par l'azote total; l'irradiation ne produit pas d'effet systématique sur la valeur du rapport stérols/azote total.

- C H A P I T R E V -

VARIATIONS COMPAREES DES ACIDES NUCLEIQUES ET DES STEROLS
DANS LA LEVURE NON IRRADIEE, ET DANS CELLE PROVENANT DE
SOU SOUCHES IRRADIEES.

§ I.- GENERALITES SUR LE ROLE BIOLOGIQUE DES ACIDES
NUCLEIQUES:

Comparer la teneur en stérols à celle en protéides (mesurée par l'azote total) pouvait paraître intéressant; rapporter cette teneur à celle en acides nucléiques était également concevable en raison des rôles biologiques primordiaux attribués à ces derniers.

En effet, l'importance biologique des acides nucléiques, pressentie depuis longtemps, s'est constamment affirmée au cours de ces dernières années; les travaux sur leur dosage et leur signification sont fort nombreux. Deux types d'acides nucléiques ont été reconnus, qui ne présentent entre eux que des différences, au premier abord relativement minimales: l'acide ribonucléique (RNA) et l'acide désoxyribonucléique (DNA), mais cependant, se comportent fort différemment l'un de l'autre.

On peut envisager DNA comme étant le représentant le plus qualifié du noyau [GAYET, 1954 (29)]. Les désoxyriboprotéides sont les constituants essentiels des chromosomes, du chromonema, et paraissent bien être vecteurs des caractères héréditaires. On a d'ailleurs pu obtenir des désoxyribonucléoprotéides et même des acides désoxyribonucléiques capables de transformer de façon héréditaire des races microbiennes d'une même espèce. La plupart des auteurs pensent que DNA est une constante cellulaire. BROWN, dans l'Annual Review of Biochemistry 1953, s'exprime ainsi à ce sujet: "Malgré les variations et le fréquent besoin d'avoir recours aux numérations pour la standardisation du tissu étudié,

il semble que la teneur en acide désoxyribonucléique d'une cellule normale soit la grandeur la plus constante parmi les variables telles que l'azote total, le poids, etc.. que l'on peut utiliser comme standard pour rapporter d'autres valeurs analytiques, exprimées d'après leur quantité par cellule.

Dans quelques études, on a employé la teneur en acide désoxyribonucléique comme référence pour rapporter les modifications d'autres constituants. Il y a de nombreux travaux dans lesquels une telle présentation de résultats aurait pu être avantageuse".

Il ne faut pas oublier que le taux de DNA varie avec la polyploïdie (les spermatozoïdes comme les levures haploïdes sont deux fois moins riches en DNA que les cellules diploïdes, celles-ci étant deux fois moins riches aussi que les cellules tétraploïdes).

Si la teneur en DNA est constante pour une cellule donnée, et que cette cellule vienne à se diviser, il faut évidemment qu'il y ait aussi, à un moment quelconque, synthèse de cette molécule. ROELS [(1954)-68)], comparant ses propres résultats à ceux obtenus, grâce à la même technique par FAUTREZ (23) en conclut que les résultats paraissent dépendre du matériel utilisé, mais que, néanmoins, la teneur en DNA est constante dans chaque cellule, sauf à un moment donné qui peut précéder ou suivre la mitose. Dans le cas de la levure, le taux de DNA doublerait au début de la prophase, de sorte que le bourgeon, dès qu'il serait visible, contiendrait autant de DNA que la cellule-mère. [OGUR, 1952-1953 (61)(62)]. Mais il y aurait donc un moment où le bourgeon n'étant pas encore visible, la future cellule-mère serait deux fois moins riche en DNA qu'une cellule voisine en interphase. Si cela était rigoureusement vrai, la teneur en DNA ne devrait pas varier avec l'âge; REDDI [(1954)(65)] l'a bien constaté avec PSEUDOMONAS, mais ABRAMS (1) disait, au contraire, que la teneur de la levure en DNA se modifiait avec l'âge - ce que nous n'avons pu confirmer dans quelques essais.

Ces considérations nous ont amené à penser que, mieux que les rapports étudiés dans les précédents chapitres, le rapport des stérols à l'acide désoxyribonucléique serait capable de nous renseigner sur le moment où la levure effectue la synthèse des stérols. La dé-

termination de ce rapport nous permet en outre de ne plus tenir compte de la délicate question du bourgeonnement: celle-ci, en effet - nous l'avons vu dans notre chapitre III - ne facilitait pas l'interprétation de notre étude sur le taux des stérols par cellule. En effet, si la teneur en stérols augmentait au moment où va débiter le bourgeonnement - alors qu'on ne peut encore le déceler à l'examen microscopique - le rapport des stérols à l'acide désoxyribonucléique resterait constant, qu'il y ait, ou non, bourgeonnement apparent.

La comparaison des deux rapports stérols/DNA dans la descendance d'une colonie irradiée, d'une part, et dans la même souche non irradiée, d'autre part, nous a paru mieux montrer les modifications survenues au métabolisme des stérols par irradiation, qu'aucun des rapports étudiés jusqu'ici ne l'avait fait.

Le dosage relativement facile de l'acide ribonucléique (RNA) sur les extraits de levure destinés au dosage de DNA, nous a incité à étudier aussi les variations du rapport stérols/RNA.

A vrai dire, le rôle de RNA est encore mal connu. On est tenté de penser qu'il assure l'hérédité des quelques caractères de certains virus où DNA n'a pu être décelé; on sait, de plus, que RNA inhibe le fonctionnement in vitro de la désoxyribonucléase; mais surtout on pense que ce corps intervient dans la synthèse des protéides. Les variations de la teneur en RNA ne sont pas toujours proportionnelles au taux de cette synthèse - ce qui se comprend maintenant qu'on envisage RNA comme un moule au contact duquel se formeraient les molécules protéiques: lorsque la synthèse protéique augmente, il n'est pas nécessaire que le nombre des molécules de RNA, jouant le rôle de moule, augmente, mais seulement que l'opération de moulage soit accélérée.

Si le rapport des stérols à l'acide ribonucléique se révélait sensiblement constant, malgré les variations de chacun de ses deux termes, (par exemple sous l'influence de l'irradiation ultra-violette), on pourrait concevoir la synthèse des stérols en rapport avec la croissance de la cellule, ce que nos déterminations antérieures laissaient envisager comme possible.

§ II.- TECHNIQUE DE DOSAGE DES ACIDES NUCLEIQUES:

Le mode de détermination des acides nucléiques dans les microorganismes, comporte en général:

- A - leur extraction de la matière cellulaire,
- B - une réaction faisant apparaître une coloration et permettant leur dosage par spectrophotométrie.

A - EXTRACTION DES DEUX ACIDES NUCLEIQUES DE LA MATIERE CELLULAIRE:

Nombreux sont les auteurs qui ont étudié l'extraction des acides nucléiques à partir de divers organismes, animaux ou végétaux. OGUR, MINCKLER et coll. (61) (62) en particulier, après avoir séché les cellules de levure sous vide poussé, solubilisent les composants non nucléiques par l'acide perchlorique 0,2 N à froid, puis extraient l'acide ribonucléique par contact de plusieurs heures à 0° avec l'acide perchlorique à 10%, tandis que l'acide désoxyribonucléique est libéré par contact à chaud avec ce même composé à 5%.

SCHMIDT et THANNHAUSER (75) opèrent sur des organes d'animaux broyés et en extraient les composés phosphorés non nucléiques et acido-solubles par l'acide trichloracétique à 7 %. Le résidu qui contient les composés nucléiques, est alors traité par un alcali pendant 15 heures à 37°, ce qui permet une séparation des deux acides nucléiques.

Quant à nous, nous avons porté notre choix sur la méthode également classique, de SCHNEIDER (76) qui - nous a-t-il semblé - offre plus de commodité. SCHNEIDER opère sur du foie de rat et sa méthode comporte les différents stades suivants:

1°) Elimination des composés phosphorés acido-solubles par une double extraction à l'acide trichloracétique à 10% à 0°.

2°) Elimination des phospho-lipides par une extraction à l'alcool, suivie de trois extractions à l'alcool-éther (trois parties d'alcool à 95° pour une partie d'éther).

3°) Extraction simultanée des deux acides nucléiques par l'acide trichloracétique à 5% à 90°.

4°) Elimination des phospho-protéines par chauffage du résidu des précédentes opérations avec la soude à 2 % .

Nous avons dû adapter à la levure fraîche ce mode d'extraction. Dans nos premiers essais, nous éliminions les composés phosphorés acido-solubles, ainsi que l'indique SCHNEIDER, par l'acide trichloracétique à 10 % à 0°. Une centrifugation était faite ensuite à la température du laboratoire - soit environ 15 à 20°.- Nous avons voulu voir si l'extraction ainsi effectuée était complète: pour cela, nous avons pratiqué des dosages de phosphore - après minéralisation suivant la technique de LACHEBOEUF (56) - dans 7 extraits successifs; or, nous constatons que la réaction colorée bleue due à l'acide phosphomolybdique réduit était encore très marquée dans le septième extrait. Ayant cherché la cause de cette persistance de phosphore dans les extraits successifs, nous avons pensé que cela pouvait provenir d'une hydrolyse partielle des acides nucléiques à la température à laquelle nous opérions. Nous avons alors fait deux expériences parallèles:

a/- dans la première expérience, les centrifugations étaient effectuées à 15-20°, température ambiante, et nous dosions le phosphore total dans le troisième extrait trichloracétique: nous y trouvions encore 11,5 μ g.

b/- dans la deuxième expérience, nous centrifugions à 0° et le Phosphore total contenu dans le troisième extrait trichloracétique n'était plus que de 5 μ g.

Il fallait donc faire l'extraction des composés phosphorés acido-solubles, et les centrifugations subséquentes, à 0° entièrement. Pratiquement, trois extractions successives à l'acide trichloracétique à 10 % à 0°, suffirent pour éliminer tout le phosphore acido-soluble car, un quatrième extrait, fait dans ces conditions, ne donne plus de coloration.

Nous nous sommes heurté par ailleurs à une autre

difficulté: les levures contiennent, comme nous l'avons dit, très peu d'acide désoxyribonucléique et nous opérons, au début, sur de faibles quantités de matériel cellulaire. En effet, les liquides extractifs étaient assez abondants et nous complétons leur volume à 20ml. Comme la réaction colorimétrique se fait sur 3 ml., notre prise d'essai se trouvait ainsi réduite aux $\frac{3}{20}$.

Pour obvier à cet inconvénient, nous avons d'abord essayé de concentrer par évaporation l'extrait trichloracétique de plusieurs manières:

- Bain-marie bouillant,
- vide sulfurique très poussé,
- Rayons infra-rouges.

Ces opérations étaient fort longues, mais surtout, l'évaporation de l'eau apportait par là même une très importante concentration de l'acide trichloracétique, ce qui altérerait la réaction colorée, ou même l'empêchait de se produire, comme nous l'avons plusieurs fois vérifié.

Nous avons donc décidé:

- 1°/ d'opérer sur de plus fortes quantités de levure de l'ordre de 5 g. frais, représentant environ 600 ml. de culture, faite dans les conditions habituelles.
- 2°/ de faire un extrait trichloracétique, non plus de 20 ml., mais seulement de 10 ml. De cette manière, la quantité d'acide désoxyribonucléique soumise au dosage sera deux fois plus forte.

En résumé, la technique que nous adoptons, est la suivante:

- 1°- Centrifugation à 0° de la culture, suivie de deux lavages successifs du culot à l'eau distillée glacée.
- 2° - Trois extractions successives:
 - a) avec 5 ml. d'acide trichloracétique à 10 % à 0°, 1 h.
 - b) avec 5 ml. d'acide trichloracétique à 10 % à 0°, 15 minutes,

- c) avec 5 ml. d'acide trichloracétique
à 10 % à 0° , 15 minutes.

Chacun de ces extraits est éliminé.

3°/ Extraction des composés nucléiques:

- a) avec 5 ml. d'acide trichloracétique
à 5 % à 90° , 15 minutes.
- b) avec 2,5 ml. d'acide trichloracétique
à 5 % à 90° , 15 minutes.
- c) avec 2 ml. d'acide trichloracétique
à 5 %, froid pour rincer le culot
convenablement.

Ces trois fractions successives sont alors réunies et on complète le tout à 10 ml. exactement dans un ballon jaugé.

B - REACTIONS COLOREES PERMETTANT LE DOSAGE DES DEUX
TYPES D'ACIDES NUCLEIQUES:

1°/ L'ACIDE DESOXYRIBONUCLEIQUE:

Ce composé, ou plutôt les produits de son hydrolyse, donnent, dans certaines conditions, une réaction colorée bleue qui permet un dosage par spectrophotométrie [DISCHE (15 Bis)] .

Nous opérons de la manière suivante: 3 ml. de l'extrait trichloracétique, exactement mesurés, sont mis en présence de 8 ml. de réactif à la diphénylamine, et on porte le tout au bain-marie bouillant pendant exactement 6 minutes. Il est très important de plonger les tubes de réaction profondément dans un bain-marie bouillant à gros bouillons, et de respecter le temps de 6 minutes, de façon à opérer toujours dans des conditions identiques. Le réactif à la diphénylamine se prépare de la manière suivante:

- 1 gr. de diphénylamine est dissous dans 2 ml. d'acide sulfurique pur, et quand la dissolution est totale, on complète le tout à 100 ml. avec de l'acide acétique cristallisable.

La coloration bleue obtenue est alors appréciée au spectrophotomètre COLEMAN à la longueur d'onde 660 m μ ; cette coloration est comparée à celles obtenues avec de l'acide nucléique de thymus (sel de sodium), provenant de la firme anglaise B D H. Ce produit n'étant pas chimiquement pur, nous l'avons analysé, quant à sa teneur en eau, par séchage sous vide poussé, en présence d'anhydride phosphorique jusqu'à poids constant. Nous avons également dosé le sodium, et avons établi le rapport du phosphore à l'azote total sur le produit desséché. La gamme de comparaison a toujours été faite avec une solution contenant 0,210g de DNA pur par litre d'eau distillée. Nous prenions des volumes croissants de cette solution-mère, volumes que nous complétions à 3 ml. exactement avec de l'acide trichloracétique à 5 %. Chacun des tubes recevait alors 8 ml. de réactif à la diphénylamine, et on portait le tout au bain-marie bouillant pendant 6 minutes exactement. Nous obtenions alors, après lecture au spectrophotomètre, une courbe sensiblement linéaire suivant la loi de BEER-LAMBERT. D'un jour à l'autre, des conditions dont nous n'étions pas facilement maître (température, âge des réactifs employés), faisaient que la pente de ces droites représentatives variait légèrement. Il a donc été préférable d'établir une nouvelle courbe étalon à chaque série de dosage.

2°/ L'ACIDE RIBONUCLEIQUE:

Les pentoses, provenant de l'hydrolyse de cet acide nucléique, donnent avec l'orcinol, en solution alcoolique, en présence d'une solution chlorhydrique de chlorure ferrique, une coloration verte, suivant la méthode de MEJBAUM (58bis) modifiée par ALBAUM et UMBREIT (Ibis).

La coloration verte obtenue est appréciée au spectrophotomètre Coleman à la longueur d'onde 625 m μ .

§ III.- RESULTATS EXPERIMENTAUX:

A - ACIDE DESOXYRIBONUCLEIQUE:

I°) dans la levure normale:

La teneur en DNA rapportée au gramme de levure

sèche, est assez variable dans nos différents essais, ce qui n'est pas pour nous surprendre puisque cette teneur peut dépendre, entre autres, des réserves contenues dans les cellules et de la rapidité du bourgeonnement.

Les résultats obtenus (exprimés en mg. par g. de levure lyophilisée) sont les suivants:

2,02 3,23 3,49 3,53 4,05 4,96 7,12

Chacun de ces chiffres représente une moyenne et l'erreur relative maxima, commise expérimentalement, a été de $\pm 5\%$.

Le chiffre le plus élevé correspond à une culture de levure qui s'est développée lentement: au bout de quinze heures, elle donnait seulement une récolte de 2 grammes environ (au lieu de 5 grammes en moyenne) et les cellules étaient plus petites.

C'est au contraire aux cellules les plus grosses que correspondait la teneur en DNA par gramme sec la moins élevée; mais entre ces extrêmes, le rapport entre teneur en DNA et poids d'une cellule ne semble pas évoluer de façon proportionnelle. Rappelons, en effet, les poids moyens d'une cellule (exprimés en 10^{-8} mg.) en les rangeant dans le même ordre que les poids de DNA par g. de levure sèche, cités ci-avant:

2,6 2,2 2,3 1,9 1,8 2,5 1,5

Aucune relation simple ne semble exister entre cette série de valeurs et celle qui la précède (voir ci-dessus)

Nous avons naturellement établi le rapport stérols/DNA en divisant le poids de stérols cellulaire par le poids de DNA cellulaire.

./.

- TABLEAU N° 8 -

VALEURS DU RAPPORT STEROLS / D.N.A. CHEZ S.CEREVISIAE
NON IRRADIÉ

N° de l'essai	D.N.A./cellule en mg. x 10 ⁻¹¹	Stérols/cellule en mg. x 10 ⁻¹¹	Stérols/D.N.A.
7	12,1	11,8	0,99
1	6,67	8,7	1,30
2	12,5	17,5	1,40
6	8,10	15,1	1,86
4	7,17	14,7	2,05
5	7,08	17,9	2,53
3	5,19	17,1	3,29

Le rapport des stérols à l'acide désoxyribonucléique est donc plus variable que chacun des deux termes qui le constitue. Nous ne voyons aucune hypothèse à proposer pour rendre compte de ces variations.

2°) dans la levure irradiée:

Les cultures dérivées de colonies irradiées ont été analysées et ont donné les valeurs suivantes pour la teneur en acide désoxyribonucléique en mg. par gramme de levure sèche:

2,30 3,40 4,00 4,65 5,26 5,95 6,22 7,21

Ces valeurs ne diffèrent pas sensiblement de celles trouvées pour la levure normale; leur moyenne arithmétique est 4,9 alors qu'elle est de 4,0 pour la levure normale, et aucune valeur n'apparaît comme particulièrement élevée ou faible.

Pour l'essai n° 3, l'irradiation a fait passer la levure de 2,02 à 3,40 et une irradiation plus prolongée à 3,72, tandis que dans l'essai n° 6, l'irradiation a eu pour effet de diminuer la teneur en acide désoxyribonucléique par gramme dans la lignée: la valeur qui était de 3,49 dans la levure normale n'est plus que de 2,30 dans les levures descendant de colonies irradiées.

L'irradiation ne modifie donc pas de manière considérable, ni systématique, la teneur en D.N.A. par gramme sec.

La levure qui a été irradiée en cascades a une teneur normale en D.N.A. par gramme (2,83 mg.); mais, les stérols augmentant, le rapport stérols/DNA augmentera également et atteindra la valeur de 4,12.

Les rapports des stérols à l'acide désoxyribonucléique, dans la levure irradiée, établis de la même façon que pour la souche-mère sont les suivants:

1,2 1,25 1,26 1,30 1,39 1,51 2,76 3,1

Ils varient sensiblement dans les mêmes limites que pour la levure normale et, dans ce cas également, nous ne sommes pas capables de proposer une hypothèse plausible pour rendre compte de ces variations.

- TABLEAU N° 9 -

VALEURS DU RAPPORT STEROLS/DNA DANS LES
LEVURES DESCENDANT DE COLONIES IRRADIEES.

N° de l'essai	DNA/Cellule en mg. x 10 ⁻¹¹	Stérols/cellule en mg. x 10 ⁻¹¹	Stérols / DNA
7	19,15	24,2	1,2
4	9,07	11,3	1,25
10	10,72	13,58	1,26
9	20,3	26,5	1,30
8	12,25	17,0	1,39
5	7,16	10,83	1,51
3	7,59	21,0	2,76
6	5,65	17,45	3,1

B.- ACIDE RIBONUCLEIQUE:

1°) dans la levure normale:

Les deux dosages que nous avons effectués sur la levure normale (souche-mère non irradiée) ont fourni des teneurs en acide ribonucléique de 105 et 128 mg. par gramme de levure lyophilisée.

Pour ces deux essais, les rapports stérols/RNA ont été établis par calcul (les rapports exprimés sont multipliés par 100): ils sont respectivement de 6,2 et 6,1.

2°) dans la levure irradiée:

Sur des cultures provenant de colonies irradiées, isolées des souches correspondant aux deux dosages précédents, on a trouvé respectivement 107 et 116 mg. par gramme de levure sèche: la variation a donc été insignifiante.

D'autres cultures provenant de colonies irradiées nous ont fourni des teneurs en RNA assez variables:

59,7 71 130 163,5 mg. par gramme de

levure sèche, sans que rien, dans les conditions de l'expérience, ne puisse permettre de rendre compte de ces variations.

Dans l'expérience d'irradiations en cascades que nous avons déjà relatée, (voir Chapitre II), la teneur en acide ribonucléique, mesurée sur les levures après 6 irradiations successives, a été de 125 mg. par gramme de substance sèche.

Les levures provenant de colonies irradiées ne montrent donc pas de grandes variations de leur teneur en R.N.A.

Les rapports stérols/RNA (les rapports exprimés sont multipliés par 100.), établis par calcul suivant le mode habituel, sont indiqués dans le tableau ci-après:

- TABLEAU N° 10 -

VALEURS DU RAPPORT STEROLS/R.N.A.
DANS LES LEVURES DESCENDANT DE COLONIES IRRADIÉES.

N° de l'essai	RNA/cellule en mg x 10 ⁻¹¹	Stérols/cellule en mg. x 10 ⁻¹¹	Stérols/RNA
5	292,6	10,83	3,7
10	265,2	13,58	5,1
6	263,2	17,45	6,6
7	356,6	24,2	6,8
8	146,6	17,0	11,6
9	168,3	26,5	15,7

Si les 4 premières valeurs sont assez voisines les unes des autres, les 2 autres en diffèrent trop notablement pour permettre de penser qu'il y ait un rapport constant des stérols à l'acide ribonucléique.

Là encore, l'irradiation n'apporte pas un changement net dans ce rapport.

- C H A P I T R E V I -

=====

LES STEROLS CHEZ RHODOTORULA MUCILAGINOSA ET
CHEZ DIFFERENTS MUTANTS PROVENANT DE SON
IRRADIATION.

Comme nous l'avons signalé (p.12) une colonie rouge est apparue au cours de nos essais d'isolement à partir d'une levure basse de brasserie. Nous l'avons repiquée, et l'examen microscopique nous a montré qu'il s'agissait d'une levure dont la plupart des cellules étaient rondes, de 5 μ de diamètre environ. Nous avons aussitôt pensé qu'il s'agissait d'une Rhodotorula provenant d'une contamination lors de la récolte ou, plus probablement, du pressage de la levure, à la brasserie. Pour assurer notre diagnostic et pour préciser l'espèce, nous avons envoyé cette levure au "Centraal Bureau voor Schimmel Cultures" à Baarn, Hollande. Celui-ci nous a donné la réponse suivante:

" Levure rouge, ronde ou ovale, mesurant en culture jeune sur moût de bière (3-4,8) x (4,5-6,5) μ ,
" assimile glucose, galactose, saccharose, maltosé et
" raffinose; pas le lactose. Le nitrate de potassium
" n'est pas capable de supporter la croissance comme
" seule source d'azote.

" La croissance dans le galactose et le maltose
" est plus lente que dans les autres sucres, mais tout
" de même bien prononcée. Ceci a été démontré dans le
" milieu liquide de Wickerham après 4 jours. Un second
" essai a donné les mêmes résultats.

" La levure dans ses caractères est semblable à
" Rhodotorula mucilaginosa (Jørgensen) Harrison. Toutefois, elle ne dédouble pas l'arbutine, ce qui
" d'ordinaire est le cas pour Rhodotorula mucilaginosa.
" Cependant, on n'attache pas de grande valeur taxonomique à la réaction de découplement de l'arbutine:

" nous n'hésitons donc pas à classer la levure dans " cette espèce ".

Nous avons voulu tester cette *Rhodotorula* au point de vue des stérols, comme nous l'avions fait pour *Saccharomyces*. Ce sont surtout les pigments des *Rhodotorula*-et tout particulièrement les caroténoïdes de *Rhodotorula rubra* - qui ont été étudiés jusqu'ici. [LEDERER (52), FROMAGEOT et TCHANG (24), KARRER et RUTSCHMANN (41)] .

Mention particulière doit être faite du travail de BONNER et Coll. (8) qui ont étudié les modifications du taux des polyènes, induits par mutation sous l'influence de l'irradiation ultra-violette chez *Rhodotorula rubra*. Nous ne croyons pas que l'on y ait dosé les stérols.

La culture s'effectue dans les mêmes conditions que celle de *S. Cerevisiae* (voir p.13); les différents dosages ont été faits exactement comme nous l'avons indiqué précédemment. Ils ont donné, en moyenne, les résultats suivants:

- TABLEAU N° II -

TENEUR de *RHODOTORULA MUCILAGINOSA* EN QUELQUES CONSTITUANTS.

	Par g. de levure sèche (en mg.)	Par cellule (en mg.x10 ⁻¹¹)
stérols	6,7	5,7
N total	63,7	54,1
D.N.A.	7,8	6,6

Rapport Stérols/Azote total : 0,11
Rapport Stérols / D.N.A. : 0,86.

Ces valeurs ne diffèrent pas sensiblement de celles notées par nous chez *S. Cerevisiae*; signalons seulement

que la teneur en D.N.A. paraît sensiblement plus élevée chez *Rhodotorula* (7,8 mg./g.) que chez *Saccharomyces* (4 mg. en moyenne) et que le rapport stérols/D.N.A. est donc sensiblement plus faible (0,86 contre 2,00 en moyenne).

Nous avons tenté des expériences d'irradiation, comme nous l'avions fait pour *Saccharomyces* (*). *Rhodotorula* est beaucoup plus résistante aux rayons ultra-violets que ne l'est *Saccharomyces*; après irradiation d'une suspension, contenant environ 1.000 cellules par ml., pendant 4 minutes à 10 cm de distance de la lampe Gallois, quelques cellules étaient encore susceptibles de se multiplier et de former des colonies (pour le détail des conditions expérimentales, voir Chapitre I).

Ces colonies n'avaient plus la belle coloration rouge de la *Rhodotorula* initiale, mais des colorations roses plus ou moins accentuées. La plupart d'entre elles sont devenues perceptibles au bout de 48 heures d'étuve, consécutives à l'irradiation. Mais certaines colonies sont apparues plus tardivement; la dernière d'entre elles n'a été perceptible que 6 jours après l'irradiation. Cette colonie a été prélevée, mise en suspension dans le milieu de culture, et le tout a été placé à l'étuve. Au bout de 15 heures, nous avons obtenu une suspension rose dont la centrifugation nous a donné un culot pesant 5,7 grammes et sur lequel nous avons fait la plupart des dosages habituels:

- TABLEAU N° 12 -

COMPOSITION DU MUTANT DE *RHODOTORULA LUCILAGINOSA* APPARU
LE 6° JOUR, APRES IRRADIATION.

	Par g.de levure sèche (en mg.)	Par cellule(en mg.x 10-11)
Stérols	6,8	8,9
N total	62,7	82
D.N.A.	9,4	12,30

(*) Une partie des résultats que nous rapportons ici a fait l'objet d'une note présentée à la Section Nancéienne de la Société de Biologie le 8 Mars 1955, en collaboration avec J. VILLOUTREIX.

Il n'y a donc pas eu de changements notables consécutifs à l'irradiation, dans les composants que nous avons analysés.

Certaines des colonies roses, qui étaient apparues 48 heures après la première irradiation, ont été mises en suspension dans le milieu de culture et ont donné des suspensions roses qui ont pu être entretenues par cultures successives. L'une de ces cultures a subi une irradiation ultra-violette de 4 minutes; 48 heures après l'irradiation des colonies roses, une colonie orange, une colonie jaune et une colonie blanche sont apparues. Les colonies jaune et orange ont été l'une et l'autre mises en suspension dans notre liquide nutritif et placées à l'étuve. Au bout de 15 heures, nous avons centrifugé et obtenu deux culots de centrifugation colorés respectivement en orange et en jaune, et pesant chacun environ 5 grammes. Nous en avons fait l'analyse.

- TABEAU N° 13 -

	Mutant orange		Mutant jaune	
	par g. de levure sèche (en mg.)	Par cellule (en mg. x 10 ⁻¹¹)	Par g. de levure sèche (en mg.)	Par cellule (en mg x 10 ⁻¹¹)
Stérols	3,9	3,51	4,6	4,86
N total	40,1	35,6	67,1	7,15
D.N.A.	9,50	8,85	6,5	6,94

Aucune de ces valeurs n'est très différente de celles notées jusqu'ici; le mutant jaune est sensiblement plus riche en Az. total et plus pauvre en D.N.A. que le mutant orange.

Le mutant blanc, cultivé sur le même milieu, n'a donné, en 15 heures, qu'un rendement extrêmement faible, et la culture a dû être poursuivie pendant 36 heures; au bout de ce temps, nous avons récolté par centri-

fugation 5 grammes environ de culot sur lequel nous avons pratiqué les dosages habituels. Il nous a été impossible de faire la numération par suite de l'aspect très particulier du bourgeonnement; en effet, la plupart des cellules étaient associées sous forme d'un pseudo-mycélium et il n'était pas possible de distinguer les cellules bourgeonnées des cellules non bourgeonnées.

- TABLEAU N° 14 -

COMPOSITION DU MUTANT BLANC DE RHODOTORULA MUCILAGINOSA

	en mg. par g. de Levure sèche
Stérols	11,6
N Total	85,7
D.N.A.	9,2

La valeur élevée des stérols s'accompagne de l'augmentation du rapport des stérols à l'azote total, celui-ci ne restant cependant guère plus élevé que pour la souche normale: 0,10. Le rapport stérols/DNA est très franchement augmenté: 1,25 ; mais chez *S. Cerevisiae*, des rapports bien supérieurs avaient été notés.

Nous avons donc une variété de *Rhodotorula Mucilaginos*a chez laquelle l'anabolisme des pigments a été fortement perturbé par suite de l'irradiation, et dont la teneur en stérols est anormalement forte.

La faible augmentation des rapports des stérols à l'azote total et des stérols à l'acide désoxyribonucléique permettrait de penser que l'élévation du taux des stérols a pu aller de pair avec une diminution des glucides ou même des lipides non stéroliques; malheureusement la culture de ce mutant s'est avérée difficile et les circonstances ne nous ont pas permis de poursuivre davantage son étude.

Une des colonies roses, provenant de la première irradiation, a été irradiée successivement 4 fois dans des conditions identiques à celles mises en oeuvre précédemment. Nous avons alors isolé une colonie de couleur rose violacée (Mutant rose violacé).

Cette nouvelle souche a été cultivée sur notre milieu standard, et au bout de 15 heures, nous avons récolté 4 g. de levure environ.

Nous avons pratiqué les déterminations habituelles:

- TABEAU N° 15 -

COMPOSITION DU MUTANT ROSE VIOACÉ DE RHODOTORULA
MUCILAGINOSA.

	Par g.de levure sèche (en mg.)	Par cellule (en mg. x 10 ⁻¹¹)
Stérols	4,7	6,7
N total	67,7	95,6
D.N.A.	10,1	14,25

Ces valeurs entrent toutes dans le cadre des variations normales que nous avons notées chez Rhodotorula et Saccharomyces.

- TABLEAU N° 16 -

RECAPITULATION DE LA TENEUR DE RHODOTORULA MUCILAGINOSA
ET DE SES MUTANTS EN QUELQUES CONSTITUANTS

Souche	Stérols		Azote total en mg. par g. de substance sèche.	Rapport Stérols	DNA	Rapport
	en mg. par g. de substance sèche.	par cellule en mg x 10 ⁻¹¹		Azote total	en mg. par g. de substance sèche.	Stérols DNA.
Rouge normale	6,7	5,7	63,7	0,10	7,8	0,86
retard de 6 jours ⁱ	6,8	8,9	62,7	0,11	9,4	0,73
Orange	3,9	3,51	40,1	0,10	9,5	0,41
Jaune	4,6	4,86	67,1	0,07	6,5	0,70
Blanche	11,6	?	85,7	0,13	9,2	1,25
Rose-violacée	4,7	6,7	67,7	0,70	10,1	0,61

En résumé, la composition de *Rhodotorula mucilaginosa* ne diffère pas beaucoup de celle de *S. cerevisiae*, et l'effet de l'irradiation, si net sur la synthèse des pigments, n'a guère été marqué sur les constituants que nous avons systématiquement déterminés. Pourtant, le mutant que nous avons appelé blanc, en dehors de son absence de coloration, est caractérisé par son mode particulier de bourgeonnement et par sa richesse en stérols, la plus élevée de celle que nous ayons notée au cours de ce travail.

- C O N C L U S I O N S -

=====

- I - Nous avons étudié l'influence de l'irradiation ultra-violette sur la teneur en stérols de *S. Cerevisiæ*, levure basse de brasserie, espérant isoler ainsi une souche qui aurait une teneur en stérols franchement anormale. Des suspensions très diluées de cellules de levures ont été soumises au rayonnement ultra-violet fourni par une lampe GALLOIS très riche en radiation de longueur d'onde 2.537 Å, dans des conditions qui n'assuraient la survie que de 5% des cellules environ. Ce sont les cellules issues de ces cellules irradiées que nous avons étudiées, en les comparant aux cellules non irradiées témoins.
- II - Nous avons dosé les stérols contenus dans la levure normale, dans la descendance des levures irradiées, et, chaque fois qu'il était possible, nous avons comparé ces 2 valeurs.

La technique que nous avons suivie est une adaptation de méthodes classiques: lyophilisation, extraction par le méthanol dans un appareil de Kumagawa, évaporation du méthanol suivie d'une reprise du résidu par le benzène purifié; chromatographie sur alumine activée, élution sélective, puis réaction de LIEBERMANN-BURCHARDT et colorimétrie à 0° entre la 5^e et la 10^e minute.

Les stérols dosés dans ces conditions au cours de deux années sur des cultures en milieu synthétique provenant d'une même souche (*S. cerevisiæ*) ont donné des chiffres compris entre 3,0 et 8,3 mg/g. sec, moyenne $5,5 \pm 1,4$. Les cultures jeunes (15h.) sont plus riches en stérols (7,2 mg./g.) que des cultures plus âgées (5,0 mg./g.).

Les stérols dosés dans les cultures issues de cellules irradiées ont été trouvés compris entre

5,8 et 11,6 mg./g.-moyenne: $8,4 \pm 1,6$. Cependant, si on ne tient compte que d'expériences vraiment comparatives, on voit que l'irradiation n'a pas toujours pour conséquence une augmentation de la teneur en stérols et que les modifications notées n'ont jamais été bien amples, contrairement à ce que nous avions espéré.

Une irradiation plus longue chez des cellules sans doute moins sensibles, n'a pas donné un taux anormal de stérols. Six irradiations successives sur des cultures issues les unes des autres ont abouti à des levures à morphologie anormale, se cultivant lentement, dont la teneur en stérols atteignait 11,6 mg., chiffre le plus élevé des chiffres rencontrés par nous dans ces essais.

III- Des numérations nous ont permis de calculer la teneur en stérols de chaque cellule de levure; la valeur moyenne est de 13×10^{-11} mg. pour la levure non irradiée, et de 18×10^{-11} mg. pour des levures provenant de cellules irradiées; cependant, lorsque la comparaison a pu être faite, nous avons vu que l'irradiation avait aussi bien provoqué une augmentation qu'une diminution de la teneur de la cellule de levure en stérols.

IV - Pensant que les substances de réserve - le glycogène que la levure peut contenir, en particulier - pouvaient masquer l'interprétation correcte de nos résultats, nous avons rapporté la teneur en stérols de la levure à l'azote total; aucune relation ne nous est apparue entre ces deux grandeurs. Dans la levure issue de cellules irradiées, aucune modification systématique ou vraiment notable du rapport des stérols à l'azote total n'a pu être notée.

V - L'importance biologique des acides nucléiques nous a incité à les doser et à étudier la variation des rapports stérols/D.N.A. et stérols/ R.N.A. Les différents essais que nous avons faits avec la levure normale, comme avec les cultures obtenues après irradiation, nous ont montré que le rapport stérols/DNA est plus variable que chacun des deux termes qui le constituent; l'étude du rapport stérols/RNA ne nous a pas permis non plus de constatations univoques. Le rapport de la teneur en stérols à celle en acides nucléiques ne nous a donc

pas permis de préciser le "moment" de la synthèse des stérols (à la naissance du bourgeon, au cours du développement de la cellule, pendant la constitution des réserves) ou le rôle éventuel des stérols chez les microorganismes.

VI- Des déterminations analogues ont été faites sur *Rhodotorula mucilaginosa*; plusieurs mutants ont pu être obtenus par irradiations successives; les dosages effectués chez ces mutants ne se sont pas montrés très différents entre eux; ils n'étaient pas non plus très différents des dosages effectués chez *Saccharomyces*.

Cependant, un mutant sans pigment visible (mutant blanc) a pu être isolé: il se caractérise par une teneur en stérols relativement élevée, double de la normale, mais l'azote total et l'acide désoxyribonucléique y sont également élevés, laissant à penser que ce mutant, d'ailleurs à prolifération lente et difficile, se distingue surtout par son absence de réserves en glucides et en lipides saponifiables.

- BIBLIOGRAPHIE -

=====

- (I) ABRAMS (R).- Phosphorous metabolism 1952, 2, 335
edited by W.D. Mc Elroy and B. Glass.
- (Ibis) ALBAUM (H.G.) , UMBREIT (W.W.).- Differentiation
between ribose - 3 - phosphate and
ribose - 5 - phosphate by means of the
orcinol pentose reaction.
J.Biol. Cnem. 1947, 167, 369-376.
- (2) ALDOUS (J.G.), STEWART (D.K.R.).- The effect of ultra-
violet radiation upon enzymatic activity
and viability of the yeast cell.
Can. J. Med. Sci. 1952, 30, 561.
- (3) ANDREASEN (A.A.), STIER (T.J.).- Anaerobic nutrition
of *Saccharomyces cerevisiae*.
J.Cell. Comp. physiol. 1953, 41, 23.
- (4) BACQ (Z.M.).- L'action indirecte du rayonnement X et
ultra-violet.
Experientia, 1951, 7, 11.
- (5) BAK (B.V.).- Effect of drying on the ergosterol content
of yeast.
Biokhimiya, 1939, 4, 93.
- (6) BENZER (S.).- Resistance to ultraviolet light as an
index to the reproduction of bacteriophage.
J. Bact. 1952, 63, 59.
- (7) BENZER (S.), JACOB (F.).- Etude du développement du
bactériophage au moyen d'irradiation par
la lumière ultra-violette.
Ann. Inst. Pasteur. 1953, 84, 186.
- (8) BONNER (J.), SANDOVAL (A.), TANG (Y.W.), ZECHMEISTER (L).-
Changes in Polyène Synthesis induced by
mutation in a red yeast (*Rhodotorula*
rubra).
Arch. Biochem. 1946, 10, 113.

- (9) BREIVIK (O.N.), OWADES (J.L.), LIGHT (R.F.).- A new tetraethenoïd sterol of yeast.
J. org. chem. 1954, 19, 1734-40.
- (10) CASPERSSON (T.) et divers coll.-
Chromosoma, 1939-1940, 1, 147, 562, 605;
1940-1941, 2, 132, 218, 222,
249, 454.
- (11) CHARONNAT (R.).- J. Pharm. Chim. Résumé des communications à la Société de Pharmacie de Paris, 1936, 23, 307.
- (12) CHRISTENSEN (E.), GIESE (A.C.).- Changes in absorption spectra of nucleic acids and their derivatives following exposure to ozone and ultraviolet radiations.
- (13) CONWAY (E.J.), BREEN (J.).- An "Ammonia" yeast and some of its properties.
Biochem. J. 1945, 39, 368.
- (14) DE COURCY (S.J.), ELY (J.O.), ROSS (M.H.).- Effect of ultraviolet light on desoxyribonucleic Acid in Rat thymocytes.
Nature 1953, 172, 119.
- (15) DEAN (A.C.R.), Sir Cyril HINSHELWOOD.- Induced and others variations in bacterial cultures.
J. Chem. Soc. 1951, 1157.
- (15B) DISCHE.- Mikrochemie 1930, 8, 4.
- (16) DULBECCO (R.).- Experiments on photoreactivation of bacteriophages inactivated with ultraviolet radiations.
J. Bact. 1950, 59, 329.
- (17) DUMAZERT (C.).- Sub-microdosage de l'azote dans la matière organique par la méthode de Kjeldahl.
Bull. Soc. Chim. Biol. 1938, tome XX, p. 1405.

- (18) ERRERA (M.).- Etude photochimique de l'Acide désoxyribonucléique.
I. Mesures énergétiques.
Biochem. biophys. Acta, 1952, 8, 30.
- (19) ERRERA (M.).- Ibid. II. Etude des produits de la photolyse.
Biochem. biophys. Acta. 1952, 8, 115.
- (20) ERRERA (M.).- Mechanisms of the action of radiations on the cell nucleus.
Ann. roy. soc. Sci. Med. Bruxelles, 1952, 5, 65-176 (d'après Abst.1952, I0230 e).
- (21) ERRERA (M.).- Induction of filamentous forms in ultraviolet-irradiated E.Coli B.
British J. Radiol. 1954, 27, 76.
- (22) ERRERA (M.), HERVE (A.).- Mécanisme de l'action biologique des radiations.
Paris. Masson et Cie, 1952, reviewed in Arch.biochem. and biophys.1953, 43, 496.
- (23) FAUTREZ (J.), FAUTREZ-FIRLEFYN (N.).- Desoxyribonucleic acid content of the cell nucleus and mitosis.
Nature, 1953, 172, 119-120.
- (24) FROMAGEOT (C.), TCHANG (J.L.).- Sur les pigments caroténoïdes de Rhodotorula Sannici.
Arch. für Mikrobiol. 1938, 9, 424-484.
- (25) GADEN (Elmer L.), HENLEY (J.R.), HENLEY (E.J.).- Induced resistance to gamma irradiation in Escherichia Coli.
J. Bact. 1953, 65, 727.
- (26) GAL'COVA (R.D.), MEJSEL'(M.N.), SELIVERSTOVA (L.A.).- Modifications du métabolisme sténique de la levure sous l'influence des rayons X.
Dokl-Akad S.S.S.R.- 1954, 98, N° 6, I013-6 (d'après le Bull. anal. du C.N.R.S. 1955, 16 (2ème partie), n° I20529).

- (27) GALIMARD (J.).- Recherche sur les stérols et la levure de bière.
Thèse Pharmacie, Paris, 1934.
- (28) GATES (Fr.).- A method of standardizing bacterial suspensions.
Journal of experimental medecine 1930, 31, 105.
- (29) GAYET (J.).- Aspect de la croissance biochimique du mésencéphale chez l'embryon de poulet.
C.R.Ac. Sci. 1954, 239, 624.
- (30) HAAS (Félix L.), WYSS (O.), BERGER (H.), STONE (W.S.).- Induction of mutations to antibiotic resistance in bacteria.
J. Bact. 1953, 65, 354.
- (31) HALDEN (W.).- Zur kenntniss des Fett- und lipoïdstoffwechsels der Hefen.
Z. physiol. chem. 1934, 225, 249.
- (32) HANAHAN, WAKIL.- Biosynthèse de l'ergostérol marqué à partir d'acétate marqué.
Arch. biochem. biophys. 1952, 37, 167.
- (33) HEINMETS (F.).- Reactivation of ultra-violet inactivated Escherichia Coli by pyruvate.
J. Bact. 1953, 66, 455.
- (34) HEINMETS (F.), KATHAN (R.H.).- Preliminary studies on the mechanism of biological action of ultraviolet irradiation and metabolic recovery phenomenon.
Arch. biochem. biophys. 1954, 53, 205.
- (35) HEINMETS (F.), LEHMANN (J.J.), TAYLOR (W.W.), KATHAN (R.H.).- The study of factors which influence metabolic reactivation of the ultra-violet inactivated Escherichia Coli.
J. Bact., 1954, 67, 511.
- (36) HOLLAENDER (A.).- Cité par Marchal J.G. dans Travaux du laboratoire de Microbiologie de la Faculté de Pharmacie de Nancy, 1953, fasc. XVII, 128.

- (37) KANAZIR (D.).- Accumulation d'acide thymidylique chez *Escherichia Coli* après irradiation ultra-violette.
Biochim. biophys. acta, 1954, 13, 589.
- (38) KANAZIR (D.), ERRERA (M.).- Teneur en adénosine triphosphate (A.T.P.) de *Escherichia Coli* après irradiation ultra-violette.
Biochim. biophys. acta, 1953, II, 451.
- (39) KAPLAN (R.W.).- Prüfung der mutagenität ultra-violettbestrahlter nukleinsäuren.
Naturwissenschaften 1953, 40, 25.
- (40) KAPLAN (S.), ROSENBLUM (E.D.), BRYSON (V.).- Adaptive enzyme formation in Radiation-sensitive and Radiation-resistant *Escherichia Coli* following exposure to ultra-violet.
J. cell. and comp. physiol. 1953, 41, 153.
- (41) KARRER (P.), RUTSCHMANN (J.).- Ein Carotinfarbstoff von neuartigem charakter aus roter Hefe (*Torula rubra*)
Helv. Chim. acta 1943, 26, 2.109.
- (42) KELLENBERGER (E.).- Les transformations des nucléotides de *Escherichia Coli* provoquées par les rayons ultra-violets.
Experientia 1952, 8, 263.
- (43) KELNER (A.).- Experiments on photoreactivation with bacteria and other microorganisms.
J. cell. comp. physiol., 1952, 39, 115-117.
- (44) KELNER (A.).- Growth, respiration, and nucleic acids synthesis in ultra-violet irradiated and in photoreactivated *Escherichia Coli*.
J. Bact. 1953, 65, 252.
- (45) KINGSLEY (George R.), SCHAFFERT (R.R.).- Determination of free and total cholesterol by direct chloroform extraction.
J. Biol. Chem. 1949, 180, 315.

- (46) KLEIN (Harold P.).- Relation of Coenzyme A to steroid and total lipid synthesis in yeast.
Féd. Proc., 1951, 10, 209.
- (47) KLEIN (Harold P.), EATON (Norman R.), MURPHY (John C.).- Net synthesis of sterols in resting cells of *Saccharomyces cerevisiae*.
Biochim. biophys. acta, 1954, 13, 591.
- (48) KLEIN (Harold P.), LIPPMANN (F.).- The relation ship of Coenzyme A to lipides synthesis.
J. Biol. Chem., 1953, 203, 95-99.
- (49) LASSEUR (P.), FLORENTIN (P.), JACOB (P.), DUPAIX-LASSEUR (A.), GAVOILLE (M.Th.), MELCION (J.), GIABICANI (R.), PEPIN (J.).- Action des radiations ionisantes sur les bactéries.
Travaux du Laboratoire de Microbiologie.
Fac.Pharm. Nancy, 1944, fasc. XIII, 224.
- (50) LATARJET (R.).- Action primaire comparée des rayons X et des rayons ultra-violets sur le *Saccharomyces ellipsoïdeus*.
Ann. Inst. Pasteur, 1944, 70, 277.
- (51) LATARJET (R.), MORENNE (P.), BERGER (R.).- Un appareil simple pour le dosage des rayonnements ultra-violets émis par les lampes germicides.
Ann. Inst. Pasteur 1953, 85, 174.
- (52) LEDERER (E.).- Recherches sur les caroténoïdes des animaux inférieurs et des cryptogames.
Thèse Paris, 1938.
- (53) LENNOX (E.S.), LURIA (S.E.), BENZER (S.).- On the mechanism of photoreactivation of ultra-violet inactivated bacteriophage.
Biochim. biophys. acta, 1954, 15, 471.
- (54) LEVY (M.),-SAPIR (M.).- Présentation d'un appareil de Parnas-Wagner modifié.
Bull. Soc. Chim. biol. 1951, 33, 198.
- (55) LOISELEUR.- Techniques de Laboratoire.
Tome I, p.736. Editeur: Masson, 1954.

- (56) MACHEBOEUF (M.), DELSAL (J.).- Sur le dosage de très petites quantités de phosphore dans les matières organiques.
Bull. Soc. Chim. Biol. 1943, 25, 116-120.
- (57) MARCHAL (J.G.).- Etude de l'action des Rayons ultraviolets sur les bactéries.
Travaux du Laboratoire de microbiologie
Fac. Pharm. Nancy, 1947, Tome XV, 60.
- (58) MATHIEU (C.).- Sur la teneur en stérols et en lipides d'un insecte (*Periplaneta americana*) dans des conditions normales et expérimentales.
Thèse Pharmacie Nancy, 1939,
- (58bis) MEJBAUM (W.).- Über die Bestimmung kleiner Pento-
semengen, insbesondere in Derivaten der
Adenylsäure.
Z. Physiol. Chem. 1939, 258, 117-120.
- (59) NADSON (G.A.).- Travaux cités dans la thèse de ROSSI-
GNOL (70) P.F. 32 et suivantes.
- (60) NEWCOMBE (H.B.).- A comparison of spontaneous and
induced mutations of *Escherichia Coli* to
streptomycine resistance and dependence.
J. Cell. Comp. physiol. 1952, 39, 13.
- (61) OGUR (M.), MINCKLER (S.), LINDEGREN (G.), LINDEGREN
(C.C.).- The Nucleic acids in a polyploid
serie of saccharomyces.
Arch. Bioch. Biophys. 1952, 40, 175.
- (62) OGUR (M.), MINCKLER (S.), DAN O. MCLARY.- Desoxy-
ribonucleic acid and the budding cycles in
the yeasts.
J. Bact. 1953, 66, 642.
- (63) OTTKE (R.C.), SIMMONDS (S.), TATUM (E.L.).- Deutero-
acetate in the biosynthesis of ergosterol
by neurospora.
J. Biol. Chem. 1950, 186, 581.
- (64) OTTKE (R.C.), TATUM (E.L.), ZABIN (I.), BLOCH (K.).-
Isotopic acetate and isovalerate in the syn-
thesis of ergosterol by neurospora.
J. Biol. Chem. 1951, 189, 429.

- (65) REDDI (K.K.).- Desoxyribonucleic Acid from *Pseudomonas hydrophila*.
Bioch. biophys. Acta. 1954, 15, 585.
- (66) REINARTZ (F.), LAFOS (H.).- Über die Lipoide der presshefe.
Angew. Chem. 1950, 62, 572.
- (67) RITTENBERG (D.), SCHOENHEIMER (R.).- Deuterium as an indicator in the study of intermediary metabolism.
J. Biol. Chem. 1937, 121, 235.
- (68) ROELS (H.).- Mitosis and deoxyribonucleic Acid content of the nucleus.
Nature 1954, 173, 1039.
- (69) RONCHESE (A.M.).- La numération des bactéries et les divers modes de détermination quantitative de la richesse en germes des suspensions microbiennes.
Thèse de Pharmacie, Paris, 1943.
- (70) ROSSIGNOL (L.).- Contribution à l'étude de l'action des radiations sur les microorganismes.
Thèse de Pharmacie. Nancy, 1945,
- (71) SANNIE (Ch.).- Note de laboratoire: "Chromatographie sous pression".
Bull. Soc. chim. de France, 1937, série 5, 4, 580.
- (72) SARACHECK (A.).- Ultraviolet inactivation of *Saccharomyces* during the budding cycle.
Exp. cell. Research. 1954, 6, 45.
- (73) SARACHECK (A.).- Inactivation de *Saccharomyces cerevisiae* par l'ultra-violet pendant le bourgeonnement.
Experientia 1954, 10, 377.
- (74) SARACHECK (A.), TOWNSEND (G.F.).- The disruption of mitochondria of *Saccharomyces* by ultra-violet irradiation.
Science 1953, 117, 31.

- (75) SCHMIDT (G.), THANNHAUSER (L.S.).- A method for the determination of DNA, RNA and phosphoproteins in animal tissues.
J. Biol. Chem., 1945, 161, 83-89.
- (76) SCHNEIDER (W.C.).- Phosphorus compounds in animal tissues.
J. Biol. chem. 1945, 161, 293-303.
- (77) SCHWENK (E.).- Chemical and Engineering news.
1954, p. 3944.
- (78) SERAYDARIAN (M.), CANZANELLI (A.), RAPPORT (D.).- Correlation of changes in the electrometric titration Absorption spectrum and Phosphate content of nucleic acid produced by ultra-violet irradiation.
Am. J. physiol. 1953, 172, 42.
- (79) SHAW (W.H.C.), JEFFERIES (J.P.).- Determination of ergosterol in yeast.
Analyst., 1953, 78, 509-514.
- (79bis) SLONIMSKI (Piotr.).- Recherches sur la formation des enzymes respiratoires chez la levure.
Paris, Thèse Sc. 1952.
- (80) SONDERHOFF (R.), THOMAS (H.).- Die Enzymatische dehydrierung der trideutero essigsäure.
Liebig's Annalen, 1937, 530, 195.
- (81) TAUFEL (K.), THALER (H.), SCHREYEGG (H.).- Zur kenntnis des fettes der hefe.
Zeit. für Untersuchung der Lebensmittel., 1936, 72, 394.
- (82) TRAININA (F.L.).- The effect of cultivation conditions on the accumulation of ergosterol in yeasts.
Proc. Sci. Inst. Vitamin. Research.
U.R.S.S. 1937, 2, N° 1, 53-61.
- (83) URION (E.).- Métabolisme hydrocarboné des levures-glycogène intracellulaire et fermentation alcoolique.
Bulletin de la Société des Sciences de Nancy, Novembre 1951, Tome X, n° 4.

- (84) VELLUZ (L.).- Substances naturelles de Synthèse ,
Paris, Masson et Cie, éditeurs.
Technique de Bougault et Coll. p.105.
- (85) WITKIN (E.).- Inherited differences in sensitivity
to radiation in Escherichia Coli.
Proc. natl. acad. Sc. U.S. 1946, 32,59.
- (86) WITKIN (E.).- Genetics of resistance to radiations
in Escherichia Coli.
Genetics 1947, 32, 221-248.

o
o o

Vu,

NANCY, le

Le Président de Thèse,

F. KAYSER.

Vu et Approuvé:

NANCY, le

Le Doyen de la Faculté,

F. KAYSER.

Vu et permis d'imprimer,

NANCY, le 3 Octobre 1955,

Le Recteur de l'Académie

Président du Conseil de l'Université,

G. MAYER.

